

Charakterisierung von tRNA Genen bei *Drosophila melanogaster*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
ROBERT KARL DUDLER
von Bassersdorf (ZH) und Thal (SG)

begutachtet von den Herren
PD Dr. E. Kubli
und
Prof. Dr. P.S. Chen

Zoologisches Institut der Universität Zürich

Zürich 1981

ADAG Administration & Druck AG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Charakterisierung von tRNA Genen bei *Drosophila melanogaster*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
ROBERT KARL DUDLER
von Bassersdorf (ZH) und Thal (SG)

begutachtet von den Herren
PD Dr. E. Kubli
und
Prof. Dr. P.S. Chen

Zoologisches Institut der Universität Zürich

Zürich 1981

ADAG Administration & Druck AG



Herrn PD Dr. E. Kubli möchte ich ganz herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. P.S. Chen danke ich für das Interesse, das er ihr entgegenbrachte. Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. W.J. Gehring, Biozentrum, Basel, für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, Einrichtungen in seinen Laboratorien zu benützen. Allen meinen Kolleginnen und Kollegen am Zoologischen Institut, vor allem Thomas Schmidt, Marianne Bienz und Martin Altwegg, möchte ich für die vielen anregenden Diskussionen herzlich danken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	6
1. Versuchstiere	6
2. Bakterienzucht und Plasmidenextraktion	6
3. Extraktion von tRNA	7
4. Sepharose 4B Chromatographie	8
5. RPC-5 Chromatographie	8
6. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	8
7. Aminoacylierung	9
8. [^{32}P]-Markierung von tRNA	9
9. [^{125}I]-Markierung von tRNA	9
10. Fingerprints	10
11. Extraktion von DNA aus Fliegen und Embryonen	10
12. Restriktionsverdauung, Agarosegel-Elektrophorese und Southern-Transfer	11
13. Hybridisierung von tRNA an filtergebundene Plasmiden DNA	13
14. Hybridisierung von [^{125}I]-tRNA an Southern Transfer Filter	14
III. RESULTATE	15
1. Charakterisierung der tRNA Gen-tragenden Plasmide 14C4, 38B10 und 63H5	15
1.1. Strategie der Experimente	15
1.2. Filterhybridisierung mit [^{32}P]-tRNA	16
1.3. Bestimmung der hybridisierenden tRNA Spezies	19
1.4. Bestimmung der Isoakzeptoren	21
1.5. Bestätigung der Identifikationen	21
2. Vergleich der tRNA Genanordnung in jungen Embryonen und adulten Fliegen	24
2.1. Isolation von reinen tRNA Isoakzeptoren	24

2.1.1. Transfer RNA ^{His} ₈ , tRNA ^{Arg} ₂ , tRNA ^{Asp} ₂₈ und tRNA ^{Asn}	24
2.1.2. Transfer RNA ^{Tyr} ₈	26
2.1.3. Transfer RNA ^{Val} ₄	27
2.2. Hybridisierung von tRNA an Southern Transfer Filter	28
2.2.1. Transfer RNA Gene in Embryonen und Fliegen	30
2.2.2. Transfer RNA Genzahlen	36
2.2.3. Unterschiede im tRNA ^{Arg} ₂ spezifischen Restriktionsmuster von DNA aus Embryonen und Fliegen	40
IV. DISKUSSION	43
1. Plasmidencharakterisierung	43
2. Transfer RNA Genorganisation	44
3. Transfer RNA Genzahlen	48
4. Bedeutung der Unterschiede im Restriktions- muster von DNA aus Embryonen und Fliegen	50
V. ZUSAMMENFASSUNG	56
VI. ABKUERZUNGEN UND DEFINITIONEN	57
VII. LITERATURVERZEICHNIS	58

I. EINLEITUNG

RNA-DNA Hybridisierungsexperimente zeigen, dass das haploide Genom von *Drosophila melanogaster* etwa 600 bis 800 tRNA Gene enthält (Ritossa et al., 1966; Tartof und Perry, 1970; Weber und Berger, 1976). Da tRNA von *Drosophila melanogaster* aus ca. 59 Sequenzfamilien besteht (Weber und Berger, 1976), ergibt sich eine Zahl von durchschnittlich 10-13 Genen für jede tRNA Basissequenz (Definition S.57).

Mittels der "in situ" Hybridisierung können die tRNA Genloci auf den polytänen Speicheldrüsenchromosomen cytologisch bestimmt werden. Die bisher erhaltenen Resultate (Kubli, 1980, für einen Ueberblick) können folgendermassen zusammengefasst werden: 1) Die tRNA Gene sind auf alle Chromosomen, mit Ausnahme des kleinen vierten, auf etwa 60 Regionen verteilt. 2) Gene für den gleichen Isoakzeptor (Definition S.57) können in verschiedenen Regionen lokalisiert sein. 3) Gene für verschiedene Isoakzeptoren können in derselben chromosomalen Region liegen.

Aus den bisherigen Daten kann kein regelmässiges Anordnungsmuster abgeleitet werden. Die disperse Verteilung der tRNA Gene steht im Gegensatz zur Anordnung anderer redundanter Gene von *Drosophila melanogaster*, wie z.B. den 5S RNA-, 18S und 28S rRNA- und der Histon-Gene. Als Repetitionseinheiten bestehen sie aus Gen- und Spacersequenzen, die hintereinander angeordnet sind ("tandem repeat") (Artavanis-Tsakonas et al., 1977; Glover und Hogness, 1977; Wellauer und Dawid, 1977; Lifton et al., 1978). Ueber die Implikationen dieses repetitiven Anordnungsmusters in bezug auf Funktion und Integrität der letztgenannten Gene existieren Hypothesen (Callan, 1967; Smith, 1974; Tartof, 1974; Finnegan et al., 1978), die in der vorliegenden Arbeit z.T. diskutiert werden (s. Diskussion).

Die Gründe und funktionellen Konsequenzen der dispersen tRNA Genanordnung bei *Drosophila melanogaster* sind nicht bekannt. Das ist z. T. auf die bis vor kurzem allein verfügbaren oben erwähnten Techniken zur Bestimmung der Genanordnung zurückzuführen, die nur ein grobes Rasterbild geben konnten.

Mit der rekombinanten DNA Technik ist es möglich geworden, Struktur und Organisation der tRNA Gene viel genauer zu studieren. Einzelne Abschnitte des *Drosophila* Genoms können z. B. in *Escherichia coli* kloniert und im Detail analysiert werden (Sinsheimer, 1977). Klone, die tRNA Gene enthalten, können relativ leicht identifiziert werden, da tRNA von *Drosophila* einfach zu isolieren ist. Diese kann radioaktiv markiert und als Hybridisierungsprobe verwendet werden, um solche Klone aus Plasmidenbanken herauszuselektionieren. Hingegen ist es in den meisten Fällen aufwendig, reine tRNA Isoakzeptoren zu isolieren, und bei *Drosophila* wurde bisher nur ein kleiner Teil der 99 Isoakzeptoren (White et al., 1973a) rein dargestellt. Daher ist es problematisch, tRNA Gen-tragende Plasmide weiter zu charakterisieren, weil die spezifischen Hybridisierungsproben oft fehlen. Dank der konstanten Sekundärstruktur aller tRNAs ist es zwar möglich, allein aus der DNA Sequenz ein tRNA Gen zu finden und zu identifizieren, auch wenn die tRNA Sequenz selbst nicht bekannt ist (Staden, 1978). Der Nachteil dieser Methode besteht aber darin, dass "blind" sequenziert werden muss, d. h. ohne zu wissen, welche tRNA Gene man studiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden drei tRNA Gen-tragende Plasmide mit einer Methode charakterisiert, die es erlaubt, die Art von klonierten tRNA Genen relativ einfach zu bestimmen, ohne dass deren Genprodukte in reiner Form zur Verfügung stehen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit einem Aspekt der tRNA Genorganisation. Wie eingangs erwähnt wurde, wird eine tRNA Basissequenz durchschnittlich von 10-13 Genen codiert. Damit stellt sich wie bei andern redundanten Genen die Frage, wodurch die repetitiven Gensequenzen konstant gehalten werden. Dass dazu die Selektion allein nicht unbedingt genügt und eventuell noch andere Mechanismen eine Rolle spielen, tritt besonders deutlich im Falle der Gene für die ribosomale RNA zu Tage. Diese in Eukaryonten hundertfach reiterierten Gene sind in hintereinanderliegenden Repetitionseinheiten organisiert ("tandem repeats"), die aus Gen- und Spacersequenzen bestehen (für einen Ueberblick s. Tartof, 1975). Die für die rRNA codierenden Sequenzen sind zwischen Arten sehr konservativ. Da die Spacersequenzen innerhalb einer Art ebenfalls konserviert sind, zwischen Arten aber eine grössere Divergenz aufweisen als die rRNA Gene, wurden Korrekturmechanismen postuliert, die für die parallele Evolution der Repetitionseinheiten innerhalb einer Art sorgen würden (Callan, 1967; Edelman and Gally, 1970; Smith, 1974). Das Modell der Crossover Fixation von Smith (1974) ist derjenige Korrekturmechanismus, der heute realistisch erscheint (Fedoroff, 1979). Er beruht auf einer genügend grossen Anzahl von "unequal" Crossover Ereignissen zwischen homologen Repetitionseinheiten, was schliesslich zur Homogenität dieser Elemente führt. Petes (1980) und Szostak und Wu (1980) haben gezeigt, dass "unequal crossover" in der rDNA von Schwesterchromatiden in Hefe mit genügend hoher Frequenz vorkommt, um die Homogenität der rDNA Repetitionseinheiten nach dem Mechanismus der Crossover Fixation zu erklären. Eine Voraussetzung für die Crossover Fixation ist die tandem Anordnung der redundanten Sequenzen.

Die Gene für 5S RNA, rRNA und Histonproteine sind in "tandem repeats" organisiert. Dasselbe trifft auch für den grössten Teil der 7800 tRNA Gene von *Xenopus laevis* zu

(Clarkson et al., 1973; Clarkson and Kurer, 1976; Müller and Clarkson, 1980), während die tRNA Gene von *Drosophila* offensichtlich anders organisiert sind (s. oben). Allerdings ist das Bild der tRNA Genanordnung vor allem ein Resultat der "in situ" Hybridisierung von tRNA Isoakzeptoren an die polytänen Chromosomen der Speicheldrüsen, die somatisches Gewebe darstellen. Wir stellten uns deshalb die Frage, ob die tRNA Genanordnung in allen Entwicklungsstadien von *Drosophila* dieselbe ist, oder ob die tRNA Gene z. B. in den Keimzellen in "tandem repeats" organisiert sind und durch somatische Neuordnungsprozesse im Laufe der Ontogenese dispers verteilt werden (Kubli, 1980). Dies würde einerseits Crossover Fixation zur Konstanzhaltung von tRNA Gensequenzen in der Keimbahn zulassen und andererseits die disperse Verteilung der Gene in Speicheldrüsenchromosomen erklären.

Solche Neuordnungs-Prozesse sind bei der Maus bekannt, wo Sequenzen, die für die variable und die konstante Region von Immunoglobulinen codieren, im Verlauf der Entwicklung neu arrangiert werden und so ein funktionelles Immunoglobulin bilden (Hozumi and Tonegawa, 1976). Evidenzen für Sequenztranslokationen während der Embryogenese gibt es auch bei Seeigeln, wobei in diesem Fall die Sequenzen und die Umordnungsprozesse nicht genau charakterisiert sind (Dickinson and Baker, 1978).

Potter und Thomas (1978) verglichen das zweidimensionale Restriktionsmuster von radioaktiver Genom DNA aus Fliegen und Embryonen von *Drosophila* nach Verdauung mit Restriktionsenzymen. Die Autoren fanden keine Differenzen, doch war einerseits die Methode zu wenig sensitiv, um kleine, spezifische Unterschiede aufzudecken, und andererseits verwendeten sie Embryonen, die schon in einem weit fortgeschrittenen Differenzierungsstadium waren. In einem solchen Fall könnten Sequenztranslokationen schon stattgefunden haben.

Eine Möglichkeit, die tRNA Genanordnung in den Keimzellen zu bestimmen, bietet prinzipiell die klassische Genetik. Da bei *Drosophila* aber bis heute keine einzige tRNA

Mutante bekannt ist, ist eine genetische Lokalisation von tRNA Genen nicht möglich. Es stehen aber biochemische Methoden zur Verfügung, um Anordnungen von Sequenzen zu vergleichen. Zu diesem Zweck muss die DNA extrahiert werden. Da es nicht möglich war, genügend DNA aus Keimzellen von *Drosophila* zu extrahieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die tRNA Genanordnung in der DNA von jungen Embryonen, deren Zellkerne noch nicht irreversibel determiniert waren, und adulten Fliegen verglichen. Dazu wurde die DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und das Muster der Fragmente, die zu spezifischen tRNAs komplementäre Sequenzen enthielten, mittels der "Southern Transfer Filter" Technik verglichen. Als Hybridisierungsproben wurden tRNA Isoakzeptoren gewählt, die auf Speicheldrüsenchromosomen in mehreren Regionen lokalisiert sind. Mit dieser Methode sollten Sequenz-Umordnungsprozesse, welche die entsprechenden tRNA Gene betreffen, mit sehr grosser Wahrscheinlichkeit entdeckt werden können.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Drosophila melanogaster des Wildstammes Oregon R wurde bei 25°C auf Standardfutter (Mais-Zucker-Agar-Hefe) gezüchtet. Drei bis 6 tägige Fliegen wurden gesammelt und bis zur Verarbeitung in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt.

Embryonen wurden von 2 bis maximal 2 1/2 stündigen Gelegen gesammelt (als 2 bis 2 1/2 stündige Embryonen bezeichnet), oder 4 stündige Gelege wurden für weitere 18 Stunden bei 25°C inkubiert (18 bis 22 stündige Embryonen). Für die Gelege wurden Plastikpetrischalen mit 1,5% Agar (versetzt mit 1% Essigsäure und 2% Aethanol) verwendet.

Wo der genetische Hintergrund der verwendeten Tiere für die Experimente besonders wichtig war, wurden die Versuche mit Embryonen der Filialgeneration der verwendeten Adulttiere wiederholt, damit sichergestellt war, dass Embryonen und Fliegen aus diesem Zuchtansatz identischen genetischen Hintergrund aufwiesen.

2. Bakterienzucht und Plasmidenextraktion

Escherichia coli (Stamm HB101) mit Ampicillin-resistenten Plasmiden (pSF 2124; So et al., 1974) wurden in L-Medium (5 g Hefe-Extrakt, 10 g Trypton und 5 g NaCl pro Liter Wasser) mit 200 µg/ml Ampicillin bei 37°C in 1 Liter Kulturen gezüchtet. Bei einer optischen Dichte von 1,0 bei 650 nm wurde den Kulturen 150 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt und während 12 h weiter inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen einer 1 Liter Kultur abzentrifugiert (20 Minuten bei 5000 rpm im GSA Rotor), mit TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) gewaschen und in 15 ml TE suspendiert. Plasmiden DNA in der "supercoil" Form wurde nach folgendem Prozedere isoliert: Nach Zugabe von 50 mg Lysozym wurde die Zellsuspension vorsichtig während 5 Minuten auf Eis gerührt, darauf 5 ml 0,5 M EDTA pH 8 zugegeben und weitere 5 Minuten

auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 ml Tritonlösung (0,1% Triton X-100, 0,06 M EDTA, 0,05 M Tris-HCl pH 8) wurde das Lysat während 60 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach der Zentrifugation (30 Minuten bei 25000 rpm in SW 27 Rotor) wurde der Ueberstand mit 5 N NaOH versetzt und bei pH 12,45 während 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde mit 1 M Tris-HCl pH 7,5 auf pH 8 neutralisiert, 1/9 Volumen 5 M NaCl zugegeben und mit 1 Volumen Phenol (destilliert, mit 3 prozentiger NaCl Lösung gesättigt) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit einem Volumen Chloroform extrahiert und während 60 Minuten bei 37°C mit 20 µg/ml RNase A inkubiert. Anschliessend wurde die Lösung mit 0,2 Volumen 5 M NaCl versetzt und die DNA mit 1/3 Volumen 30 prozentigem Polyäthylenglycol 6000 ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in 0,05 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M NaCitrat) aufgenommen, 3 mal mit Phenol und danach 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Anschliessend wurde die DNA mit 2 Volumen Aethanol aus der wässrigen Phase ausgefällt und in 1 ml TE pH 8 aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde photospektrometrisch bestimmt (1 A₂₆₀ Einheit = 50 µg DNA). Die so erhaltenen Plasmidenpräparate waren frei von nachweisbaren RNA- und Bakterien-Genom-DNA-Kontaminationen, soweit dies mittels Agarosegelelektrophorese (0,8% Agarose) beurteilt werden kann.

3. Extraktion von tRNA

Drosophila melanogaster tRNA wurde mit der Phenolmethode von Kirby (1956) extrahiert. Nach Fällung der hochmolekularen RNA mit Kaliumacetat (Kern, 1975) wurde die in Lösung bleibende kleinemolekulare RNA ausgefällt und über Sephadex G-100 chromatographiert (White and Tener, 1973). Die tRNA enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, ausgefällt und in destilliertem Wasser aufbewahrt. Das genaue Prozedere wurde früher beschrieben (Dudler, 1977).

4. Sepharose 4B Chromatographie

Die Fraktionierung von tRNA mittels Sepharose 4B Chromatographie wurde nach den Angaben von Holmes et al. (1977) durchgeführt. Achthundert A_{260} Einheiten ($1 A_{260}$ Einheit = $40 \mu\text{g}$ RNA) tRNA wurden auf eine $0,9 \times 40 \text{ cm}$ Sepharose 4B Kolonne aufgetragen und bei einer Flussgeschwindigkeit von 40 ml/h mit einem inversen Salzgradienten chromatographiert. Gradient: $500 \text{ ml } 1,3 \text{ M} - 0 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM NaAcetat $\text{pH } 4,5$, 10 mM MgCl_2 , $6 \text{ mM Mercaptoäthanol}$, 1 mM EDTA .

5. RPC-5 Chromatographie

Es wurde das von Hosbach (1977) beschriebene System nach Pearson et al. (1973) mit einer Säule von $0,9 \times 64 \text{ cm}$ verwendet. Die Chromatographie wurde mit einem linearen Salzgradienten von $0,55 - 0,8 \text{ M NaCl}$ in zwei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt:

Acetatpuffer: 10 mM NaAcetat $\text{pH } 4,5$, 10 mM MgCl_2 ,
 $1 \text{ mM Mercaptoäthanol}$ (Grigliatti et al., 1974).

Formiatpuffer: 10 mM NaFormiat $\text{pH } 3,8$, 1 mM EDTA ,
 $1 \text{ mM Mercaptoäthanol}$ (Dunn et al., 1978).

6. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2-d PAGE)

Es wurde das von Egg (1978) modifizierte Gelsystem von Blatt und Feldmann (1973) verwendet. Auf ein 3 mm dickes Gel (1. Dimension = 10% Polyacrylamid, 2. Dimension = 20% Polyacrylamid) wurden $10 A_{260}$ Einheiten tRNA in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ aufgetragen. Gele für analytische Zwecke wurden in Stains All ($0,05\%$ Stains All (Serva) in 50% Formamid) gefärbt und mit Leitungswasser entfärbt. Für präparative Zwecke wurden die Gele mit einer Lösung von Ethidiumbromid ($50 \mu\text{g/ml}$) gefärbt. Einzelne RNA Flecken sind im UV Licht sichtbar. Die Flecken wurden ausgestanzt, durch eine 1 ml

Plastikspritze gepresst und über Nacht in 2 Volumen Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat pH 5, 10 mM MgAcetat, 0.1 mM EDTA, 0,1% SDS) bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (5 Minuten bei 7000 rpm im Rotor HS4) wurde der Ueberstand über Dowex W 50 Kationentauscher (äquili-briert mit TE pH 7,5 , 0,2 M NaCl) vom Ethidiumbromid ge-tennt. Die tRNA wurde 2 mal mit 2,5 Volumen Aethanol ausge-fällt und in destilliertem Wasser aufgenommen.

7. Aminoacylierung

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden nach der Methode von Olexa (1977) präpariert und bei -90°C während höchstens 4 Wochen aufbewahrt. Die Acylierungsreaktion wurde unter den von White und Tener (1973) beschriebenen Bedingungen durch-geführt. Für die Hybridisierung von Aminoacyl-tRNA wurde die tRNA gebundene Aminosäure mit HNO_2 desaminiert, um die De-acylierung während der Hybridisierung zu verringern (Hervé and Chapeville, 1965). Die Reaktion wurde nach den Angaben von Clarkson et al. (1973) durchgeführt.

8. [^{32}P]-Markierung von tRNA

Für die Präparation von uniform [^{32}P]-markierter tRNA wurden Zellen der Drosophila Zelllinie Schneider 3 in [^{32}P]-haltigem Medium inkubiert. Die Kultur der Zellen und die Isolation der tRNA erfolgte nach den Angaben von Matouschek et al. (1980).

9. [^{125}I]-Markierung von tRNA

Die Markierung von tRNA Isoakzeptoren mit [^{125}I] (NEN, Kat. Nr. NEZ-033L) wurde ohne Modifikation mit der von Prenskey (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurden jeweils 2 bis 4 μg eines reinen tRNA Isoakzeptors iodiert. Nach der Reaktion wurde die iodierter tRNA zusammen mit 1,5 A_{260} Einheiten "carrier" RNA (Drosophila 5S RNA, 2 mal über Sepha-

dex G-100 und anschliessend mittels PAGE gereinigt) durch DEAE-Cellulose Chromatographie von niedermolekularen Iodverbindungen getrennt. Die RNA wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 , 1 mM EDTA, 0,25 M NaCl an die Säule gebunden und nach dem Waschen mit 1 M NaCl im gleichen Puffer eluiert. Anschliessend wurde die RNA in 300 μ l 50 mM Tris-HCl pH 7,5 , 1 mM EDTA, 10 mM Na₂SO₃, 0,25 M NaCl aufgenommen und während 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Bei der anschliessenden Chromatographie über Sephadex G-25 (in einer Pasteurpipette) konnte ein kleiner Teil der Radioaktivität in einer kleinemolekularen Form abgetrennt werden. Durch dieses Prozedere konnte der unspezifische "background" bei Filterhybridisierungen verringert werden. Die iodierter tRNA wurde in destilliertem Wasser während höchstens 4 Wochen bei -20°C aufbewahrt.

10. Fingerprints

Für Fingerprintanalysen von iodierten tRNA Isoakzeptoren wurden Standardmethoden verwendet (Brownlee, 1972).

11. Extraktion von DNA aus Fliegen und Embryonen

Jeweils 3 bis 4 g Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert und in 30 ml Homogenisationspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 350 mM Saccharose) in einem Potterhomogenisator auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Nylonnetz (Polymon, PES 400-37 ASTM) filtriert und bei 1000 x g während 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml Homogenisationspuffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Dieses Vorgehen wurde 2 bis 3 mal wiederholt, bis der Ueberstand klar blieb. Ohne diese sorgfältige Reinigung der Kerne wurde nur stark degradierte DNA erhalten. Das so erhaltene Rohpräparat von Zellkernen wurde in 3 ml TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen, mit 1 Volumen Lysepuffer versetzt

(100 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM EDTA, 300 mM NaCl, 4% Sarkosyl) und während 20 Minuten bei 65°C inkubiert. Das Lysat wurde abgekühlt, mit 5 M NaPerchlorat (0,14 ml/ml Lysat) versetzt und 2 mal mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) während 15 Minuten sorgfältig am Rotationsverdampfer ausgeschüttelt. Anschliessend wurde die wässrige Phase mit CsCl versetzt, bis die Dichte der Lösung 1,7 g/ml betrug (12,7 g CsCl/13,2 ml Endvolumen). Nach der Zentrifugation bei 36000 rpm (Rotor Ti 60) während 40 h wurden die Dichtegradienten fraktioniert (0,3 ml Fraktionen), die viskösen Fraktionen gesammelt und extensiv gegen TE dialysiert. Die DNA Konzentration wurde photospektrometrisch bestimmt (1 A₂₆₀ Einheit = 50 µg DNA) und die DNA bei -20°C aufbewahrt.

Für die DNA Extraktion aus Embryonen wurden ca. 30 g Embryonen dechorioniert (Behandlung mit 3 prozentiger Na-Hypochlorit-Lösung während 1 Minute) und danach wie oben beschrieben im Potterhomogenisator homogenisiert. Die Reinigung der Kerne war bei Embryonen nicht kritisch für die Integrität der DNA; dennoch wurden alle Schritte genau wie oben beschrieben durchgeführt.

12. Restriktionsverdauung, Agarosegel-Elektrophorese und Southern-Transfer

Die Verdauung von DNA mit den Restriktionsenzymen Eco R I, Hind III und Bam H I (Böhringer, Mannheim) wurde nach den Vorschriften der Herstellerfirma durchgeführt. Es wurde mit 1 Einheit Restriktionsenzym pro µg DNA während 4 h bei 37°C verdaut. Zusammen mit der Drosophila DNA wurde immer auch λ-Phagen DNA (1/5 der Menge von Drosophila DNA) als interne Kontrolle verdaut. Auf dem Agarosegel konnte so die Vollständigkeit der Verdauung überprüft werden. Nach Abschluss der Reaktion wurde die DNA mit 2,5 Volumen Aethanol ausgefällt und in "Loening-Puffer" (36 mM Tris base, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA; Loening, 1969) aufgenommen.

Die Restriktionsfragmente wurden mittels horizontaler Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Gele enthielten 0,7% Agarose (Bio Rad Cat. 162-0100) in Loening-Puffer und hatten Dimensionen von 13 x 12 x 0,9 cm. Pro Auftragsschlitze wurden 12 μ g verdauete DNA (10 μ g Drosophila- und 2 μ g λ -Phagen-DNA) aufgetragen. Dazu wurde die gelöste DNA mit 1 Volumen Auftragspuffer versetzt. Der Auftragspuffer bestand aus einem 0,2% Agarosegel in 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.01% Bromphenolblau, das mittels Durchpressen durch eine Spritze homogenisiert wurde (Schaffner et al., 1976). Es wurde darauf geachtet, dass das Probenvolumen und das Volumen des Auftragsschlitzes (8 x 2 x 6 mm) identisch waren, d. h. dass die Schlitze bis oben gefüllt waren. Nach Abschluss der Elektrophorese (nach 15 h bei 18 V und 35 mA; das Bromphenolblau war ca 3/4 der Gellänge gewandert) wurden die Gele in Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml TE) gefärbt und im UV Licht mit einer Polaroid Kamera photographiert. Die gut sichtbaren Fragmente der λ -DNA dienten als Kontrolle für die Vollständigkeit der Verdauung und zugleich als Molekulargewichtsmarker (Die Grössen der Restriktionsfragmente wurden dem "Boehringer Biochemica Dienst" entnommen, da die λ -DNA von Boehringer bezogen wurde).

Die DNA Fragmente wurden anschliessend vom Gel auf Nitrocellulose Filter (Sartorius SM 11358, Porengrösse 0,1 μ m) nach der Methode von Southern (1975) übertragen. Nach dem Transfer wurden die Filter in 2 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und während 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

13. Hybridisierung von tRNA an filtergebundene Plasmiden DNA

Für die Hybridisierung von [^{32}P]-markierter tRNA an filtergebundene Plasmiden DNA wurde nach den Angaben von Clarkson et al. (1973) gearbeitet. Plasmiden DNA wurde während 1 h bei 37°C in 0,5 N NaOH denaturiert. Anschliessend wurde sie mit 2 Volumen Neutralisationspuffer (0,25 M Tris-HCl pH 8, 0,25 N HCl, 1,5 M NaCl) versetzt und sofort auf Nitrocellulose Filter (Milliore HAWP 02500, 0,45 μm Porengrösse) aufgetragen. Pro Filter wurden ca. 80 μg DNA gebunden. Die Filter wurden luftgetrocknet und anschliessend während 2 h im Vakuumofen bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung wurde in 1,15 M NaAcetat pH 5, 60% Formamid bei 43°C durchgeführt. In diesen Experimenten wurde mit einem R_{ot} 1/2-Wert von ca. 6×10^{-4} Mol sec/l für einen reinen tRNA Isoakzeptor gerechnet (S. Clarkson, persönliche Mitteilung). Für die Berechnung der R_{ot} -Werte wurde angenommen, dass totale tRNA aus 59 Sequenzfamilien (Weber and Berger, 1976) besteht und dass die verwendete [^{32}P]-RNA Präparation zu 25% aus tRNA besteht. Dieser Wert beruht auf der Analyse mit Sephadex G-100 Chromatographie.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter in Hybridisierungspuffer bei 43°C während 30 Minuten und danach 2 mal 20 Minuten in 2 mal SSC bei Raumtemperatur gewaschen.

Für die Elution der hybridisierten tRNA von den Filtern wurden diese während 2 mal 5 Minuten in 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 90% Formamid bei 65°C inkubiert. Die beiden Fraktionen wurden gesammelt und mit 1/9 Volumen 4,6 M NaAcetat pH 4,8 versetzt. Nach Zugabe von 10 A_{260} Einheiten unmarkierter totaler tRNA wurde mit 2,5 Volumen Aethanol ausgefällt. Diese Probe wurde anschliessend mittels 2-d PAGE aufgetrennt.

Die Hybridisierung von [^{14}C]-Aminoacyl-tRNA und [^{125}I]-tRNA erfolgte ebenfalls nach den oben gemachten Angaben.

14. Hybridisierung von [^{125}I]-tRNA an Southern Transfer Filter

Die Nitrocellulose Filter wurden einzeln in Haushalt-plastiksäcke eingeschweisst und mit 10 ml Hybridisierungspuffer bei 42°C für 20 h inkubiert. Der Hybridisierungspuffer wurde mit geringen Modifikationen von Stark und Williams (1979) übernommen und war folgendermassen zusammengesetzt: 5 x SSC, 50% deionisiertes Formamid, 0,3 mg/ml Ficoll 400 (Pharmacia), 0,2% SDS, 100 µg/ml tRNA aus E. coli (Boehringer, Mannheim), 0,02% Rinderserumalbumin (Sigma). Das Rinderserumalbumin wurde vor Gebrauch für 2 h bei 37°C mit 0,05% Diäthylpyrocarbonat behandelt. Der Hybridisierungspuffer enthielt maximal 10^6 cpm/ml [^{125}I]-tRNA. Höhere Konzentrationen von Radioaktivität ergaben einen unzulässig hohen "background". Diese Bedingungen entsprachen einem R_{ot} -Wert von $0,7 \times 10^{-3}$ bis $1,6 \times 10^{-3}$ Mol sec/l, je nach spezifischer Aktivität der jeweiligen tRNA. Das entsprach etwa dem 0,5 bis 1,5 fachen R_{ot} 1/2 -Wert eines reinen tRNA Isoakzeptors, wenn der R_{ot} 1/2 -Wert von totaler tRNA gleich $8,6 \times 10^{-2}$ Mol sec/l gesetzt wird (Yen et al., 1977) und angenommen wird, dass im Cytoplasma 60 tRNA Sequenzen in gleichen Mengen vertreten sind.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter 2 mal 45 Minuten bei 37°C in 5 x SSC, 50% Formamid gewaschen und danach während 20 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC gespült. Anschliessend erfolgte eine RNase Verdauung in 2 x SSC, 10 µg/ml RNase A bei 37°C während 60 Minuten. Nach 3 maligem Waschen in 2 x SSC für je 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Filter luftgetrocknet und mit Kodak X-Omat S Filmen und Ilford Fast Tungstate Verstärkerplatten (Laskey and Mills, 1977) während 2 bis 3 Wochen bei -90°C autoradiographiert.

III. R E S U L T A T E

1. Charakterisierung der tRNA Gen-tragenden Plasmide 14C4, 38B10 und 63H5

Die rekombinanten Plasmide 14C4, 38B10 und 63H5 stammen aus einer von Artavanis-Tsakonas et al. (1977) konstruierten Klonbank von embryonaler Drosophila DNA. Gescherte DNA wurde mit der poly[dA-dT] Kombinationsmethode (Lobban and Kaiser, 1973) in die Eco R I Restriktionsstelle des Ampicillin-resistenten Plasmiden pSF 2124 (So et al., 1975) integriert. Ein Teil dieser Klone wurde mit [³²P]-tRNA von kultivierten Drosophilazellen mit der Koloniehybridisierungsmethode von Grunstein und Hogness (1975) hybridisiert. Die drei erwähnten Plasmide ergaben positive Resultate. Sie enthalten DNA Fragmente von 18 kb (14C4), 7,5 kb (38B10) und 2,5 kb (63H5) (Dudler et al., 1980).

Grundlage für die Identifikation der von diesen Plasmiden codierten tRNA Spezies bildete das gute Auflösungsvermögen der zweidimensionalen Polyacrylamidgele. Transfer RNA von Drosophila melanogaster kann in 30 bis 40 starke und 20 bis 30 schwächere Flecken aufgetrennt werden (Abb.1a). Ein Teil dieser Flecken stellt reine tRNA Isoakzeptoren dar, die deshalb auf einfache Art isoliert werden können. Von mehreren Gelen kann genügend tRNA aus einzelnen Flecken isoliert werden, um Aminoacylierungsversuche mit allen 20 Aminosäuren durchführen zu können. Auf diese Weise wurden mehrere Flecken identifiziert (Abb.1a).

1.1. Strategie der Experimente

Die klonierten tRNA Gene wurden nach folgender Strategie charakterisiert:

Totale [³²P]-tRNA aus Zellkulturen der Drosophila Zelllinie Schneider 3 wurde an filtergebundene Plasmiden

DNA hybridisiert. Die hybridisierten tRNAs wurden anschließend eluiert und zusammen mit totaler nicht radioaktiv markierter *Drosophila* tRNA auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden gefärbt und danach autoradiographiert. Diejenigen Flecken, welche die hybridisierten tRNAs enthielten, waren auf dem Röntgenfilm markiert. Die tRNA der entsprechenden Flecken mehrerer Gele mit nicht markierter tRNA wurde extrahiert. Die Spezifität der entsprechenden tRNAs wurde durch Aminoacylierungsversuche mit allen 20 Aminosäuren bestimmt. Die Isoakzeptoren wurden mittels RPC-5 Chromatographie identifiziert.

1.2. Filterhybridisierung mit [32 P]-tRNA

Pro Plasmid wurden 5 Filter mit je 80 μ g aufgebackener Plasmiden DNA in einem Volumen von 3 ml mit jeweils 30 μ g/ml [32 P]-tRNA während 4 h hybridisiert. Dies entspricht ca. dem 8-fachen R_0 t 1/2 -Wert (Material und Methoden, Kap. 13). Nach dem Waschen der Filter wurden die Hybride denaturiert und die tRNA aus der Elutionslösung ausgefällt. Die so gewonnenen radioaktiven Proben wurden zusammen mit je 10 A₂₆₀ Einheiten kalter totaler tRNA auf zweidimensionalen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Resultate sind in Abb. 1 dargestellt. Zu 38B10 komplementäre tRNA ist in Flecken 1 zu finden (Abb. 1b), während von 14C4 eluierte tRNA sich auf drei verschiedene Flecken verteilt: Nr. 2, 3 und 4 (Abb. 1c). Transfer RNA von 63H5 wandert vor allem in Flecken 5, markiert aber auch in kleinem Masse Flecken 1 (Abb. 1d).

Die 3 Flecken, die zu 14C4 komplementäre tRNAs enthielten, wurden extrahiert und die Radioaktivität gemessen. Die Radioaktivitätsverhältnisse von Flecken 3 : Flecken 2 : Flecken 4 waren 9500 cpm : 6500 cpm : 650 cpm = 3 : 2 : 0,2. In Annäherung kann angenommen werden, dass die spezifische Aktivität verschiedener tRNAs etwa gleich ist (Bei 2-d Auftrennung von [32 P]-tRNA auf Polyacrylamidgelen entsprechen die Farbtintensitäten der Flecken auf dem gefärbten Gel

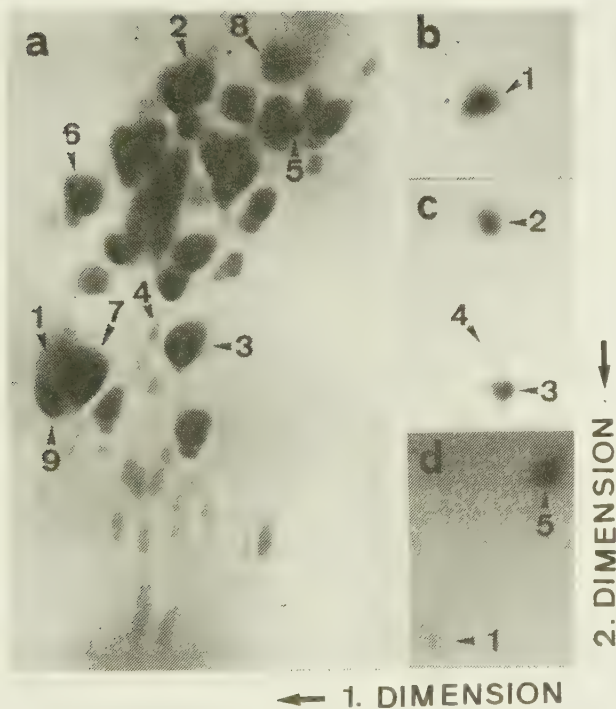


Abb. 1:

a) Zweidimensionale PAGE von totaler tRNA (Stains All gefärbt). Die tRNA Spezies der einzelnen Flecken wurde durch Aminoacylierung der eluierten tRNA bestimmt. So enthält Flecken 1 tRNA^{His} und tRNA^{Ala}, Flecken 2 tRNA^{Asn} und tRNA^{Pro}, Flecken 3 tRNA^{Arg}, Flecken 5 tRNA^{Asp}, Flecken 6 tRNA^{Gly}, Flecken 7 tRNA^{Ala}, Flecken 8 tRNA^{Ser} und Flecken 9 tRNA^{His}.

b-d) Autoradiogramme von 2-d Gelen mit [³²P]-tRNA, die an 38B10 (b), 14C4 (c) und 63H5 (d) hybridisierte. Die markierten Flecken können mit den entsprechend nummerierten Flecken auf dem gefärbten Gel (a) zur Deckung gebracht werden. Demzufolge hybridisiert 38B10 mit tRNA^{His} und/oder tRNA^{Ala}, 14C4 mindesten mit tRNA^{Arg} und tRNA^{Asn} und/oder tRNA^{Pro}, und 63H5 mit tRNA^{Asp} und tRNA^{Ala} und/oder tRNA^{His}.

den Schwärzungsintensitäten der entsprechenden Flecken auf dem Autoradiogramm). Somit ist es nicht wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Radioaktivitätsmengen der Flecken 2, 3 und 4 auf unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der entsprechenden tRNAs beruhen. Es bleiben vor allem 2 Erklärungsmöglichkeiten für die schwache Markierung von Flecken 4 im Vergleich zu Flecken 2 und 3: Da Flecken 4 auch auf dem gefärbten Gel sehr schwach ist (Abb. 1a), könnte mit zu kleinem R_{ot} hybridisiert worden sein, so dass die tRNA in Flecken 4 nur unvollständig hybridisierte. Der Plasmid 14C4 würde somit 3 verschiedene Arten von tRNA Genen tragen. Eine andere Möglichkeit ist, dass tRNA aus Flecken 4 mit den gleichen Sequenzen hybridisiert wie eine der beiden tRNAs aus den starken Flecken. Es würde sich demnach um eine modifizierte, isogenische Spezies einer der beiden "Hauptflecken" tRNAs oder um eine nicht verwandte aber kreuzhybridisierende tRNA handeln. In diesem Falle würde 14C4 nur für 2 verschiedene tRNA Basissequenzen codieren. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten entscheiden zu können, wurde das Hybridisierungsexperiment mit einem 4-fach höheren R_{ot} Wert wiederholt. Die Ergebnisse des ersten Experimentes konnten recht gut reproduziert werden, d. h. tRNA aus Flecken 4 hybridisierte nicht in grösserem Ausmass (Flecken 3 : Flecken 2 : Flecken 4 = 11500 cpm : 6700 cpm : 1030 cpm = 3,4 : 2 : 0,3). Dies unterstützt die Annahme, dass es sich entweder um eine modifizierte isogenische tRNA einer der beiden Hauptflecken tRNAs oder um eine unabhängige, aber kreuzhybridisierende tRNA handelt. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass das Plasmid 14C4 nicht doch für eine dritte tRNA Basissequenz codiert.

Die Radioaktivität der beiden Flecken, die mit 63H5 hybridisierende tRNA enthielten, wurde ebenfalls gemessen. Das Verhältnis war Flecken 5 : Flecken 1 = 8100 cpm : 1300 cpm = 6 : 1 .

1.3. Bestimmung der hybridisierenden tRNA Spezies

Die Akzeptorspezifität der zu den Plasmiden komplementären tRNAs wurde mit Aminoacylierungsexperimenten bestimmt. Aus 8 bis 10 präparativen 2-d Polyacrylamidgelen wurde tRNA aus den Flecken 1, 2, 3 und 5 eluiert. Die Resultate der Aminoacylierungsversuche mit allen 20 Aminosäuren sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Aus Flecken 4 konnte nicht genügend tRNA isoliert werden.

Plasmid	tRNA aus Flecken	Aminosäure	pMol/A ₂₆₀
38B10	1	His	1250
		Ala	350
14C4	2	Asn	460
		Pro	490
	3	Arg	1200
63H5	5	Asp	1080
	1		

Tab. 1: Bestimmung der Akzeptorspezifität der aus Polyacrylamidgelen eluierten tRNAs durch Aminoacylierung mit allen 20 Aminosäuren. Nur die positiven Resultate sind angegeben.

Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, dass Flecken 5 nur tRNA^{Asp} enthält. Somit codiert das Plasmid 63H5 für tRNA^{Asp}. Das Plasmid 14C4 enthält Gene für tRNA^{Arg}, da Flecken 3 nur diese tRNA enthält. Hingegen besteht Flecken 2 aus einem Gemisch aus tRNA^{Asn} und tRNA^{Pro}, und es kann daher nicht entschieden werden, für welche der beiden tRNAs 14C4 codiert. Ebenso enthält Flecken 1 neben tRNA^{His} noch

eine geringe Menge an tRNA^{Ala}, so dass nicht eindeutig bestimmt werden kann, für welche der beiden tRNAs 38B10 codiert. Um diese Mehrdeutigkeiten zu beseitigen und um die Resultate zu bestätigen, wurde Aminoacyl-tRNA, die an der Aminosäure radioaktiv markiert war, an die Plasmide hybridisiert. Die Resultate sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Plasmid	hybridisierte tRNA	cpm auf Filter mit 80 µg Plasmiden DNA	cpm auf Filter ohne DNA
63H5	[¹⁴ C]-Asp-tRNA	36	24
	[¹⁴ C]-Ala-tRNA	25	27
	[¹⁴ C]-His-tRNA	26	25
38B10	[¹⁴ C]-His-tRNA	42	24
	[¹⁴ C]-Ala-tRNA	26	28
14C4	[¹⁴ C]-Arg-tRNA	78	23
	[¹⁴ C]-Asn-tRNA	75	22
	[¹⁴ C]-Pro-tRNA	22	23

Tab. 2: Hybridisierung von Aminoacyl-tRNA an filtergebundene Plasmiden DNA.

Die Werte in Tabelle 2 liegen knapp über dem Background, da während der Hybridisierungsreaktion in beträchtlichem Ausmass Deacylierung stattfand, obwohl die Esterbindungen der Aminoacyl-tRNAs nach Hervé und Chapeville (1965) stabilisiert wurden. Trotzdem lässt sich bestimmen, dass 14C4 für tRNA^{Arg} und tRNA^{Asn}, hingegen nicht für tRNA^{Pro} codiert. Die Daten deuten eine Hybridisierung von tRNA^{His} mit 38B10 und von tRNA^{Asp} an 63H5 an, während eine Hybridisierung von tRNA^{Ala} nicht nachgewiesen werden kann. Wegen der geringen spezifischen Aktivitäten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass 63H5 neben tRNA^{Asp} Genen noch andere tRNA Gene trägt und dass 38B10 neben Genen für tRNA^{His} auch solche für tRNA^{Ala} enthält.

1.4. Bestimmung der Isoakzeptoren

Die von den Plasmiden codierten Isoakzeptoren wurden mittels RPC-5 Chromatographie bestimmt. Transfer RNAs, die aus den Gelflecken 1,3 und 5 eluiert worden waren, wurden mit den entsprechenden [^{14}C]-Aminosäuren beladen. Diese Proben wurden zusammen mit totaler tRNA, die mit den entsprechenden [^3H]-Aminosäuren beladen wurden, über RPC-5 chromatographiert (Abb. 2). Ein solches Doppelmarkierungsexperiment war mit tRNA^{Asn} nicht möglich, da [^3H]-Asparagin nicht erhältlich ist.

Aus Abb. 2 geht hervor, dass Flecken 3 den Isoakzeptor tRNA^{Arg}₂ enthält, während in Flecken 5 die Isoakzeptoren tRNA^{Asp}₂ und tRNA^{Asp}₂ zu finden sind. Die letzteren beiden Isoakzeptoren unterscheiden sich aber nur durch eine Basenmodifikation im Anticodon, wobei tRNA^{Asp}₂ an der ersten Stelle des Anticodons die modifizierte Base Q, tRNA^{Asp}₂ hingegen an dieser Stelle ein unmodifiziertes G trägt (White et al., 1973). Die beiden Isoakzeptoren sind somit isogenisch. Flecken 1 enthält die Isoakzeptoren tRNA^{His}₁ und tRNA^{His}₁, die sich ebenfalls nur an der ersten Stelle des Anticodons unterscheiden. Transfer RNA^{His}₁ enthält die Base Q, während tRNA^{His}₁ ein G trägt (White et al., 1973). Auch diese Isoakzeptoren sind isogenisch.

1.5. Bestätigung der Identifikationen

Um die erhaltenen Resultate zu überprüfen, wurden die den Plasmiden zugeordneten Isoakzeptoren mittels verschiedener chromatographischer Methoden und 2-d PAGE isoliert. Die Isolation ist in Kap. 2.1. beschrieben. Diese Proben wurden mit [^{125}I] radioaktiv markiert und an die Plasmide hybridisiert. Die Resultate dieser Experimente sind in Tabelle 3 dargestellt.

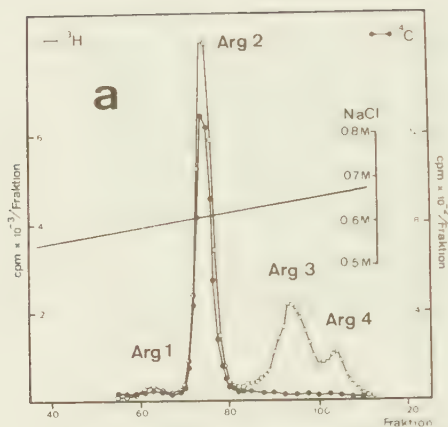
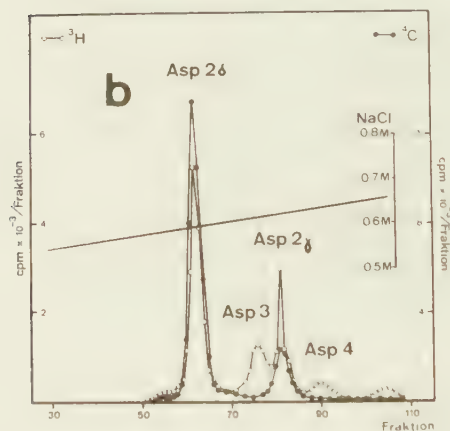
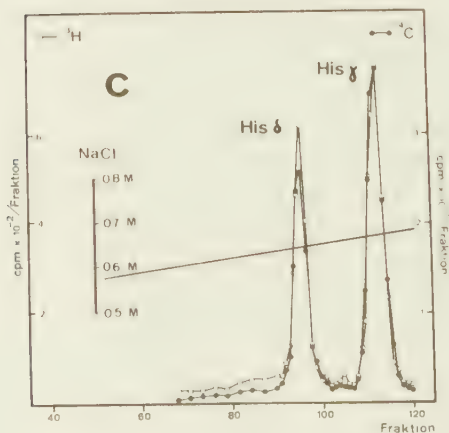


Abb. 2: RPC-5 Chromatographie von Aminoacyl-tRNA im Acetatpuffersystem. Die Bezeichnung der Peaks erfolgte gemäss Grigliatti et al. (1974).

a) Kochromatographie von [^{14}C]-Arginyl-tRNA aus Flecken 3 (Abb. 1a) mit totaler tRNA, die mit [^3H]-Arginin aminoacyliert war. Flecken 3 enthält demnach den Isoakzeptor $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$.



b) Kochromatographie von [^{14}C]-Aspartyl-tRNA aus Flecken 5 (Abb. 1a) mit totaler tRNA, die mit [^3H]-Asparaginsäure aminoacyliert war. Flecken 5 enthält folglich die Isoakzeptoren $\text{tRNA}_{2\gamma}^{\text{Asp}}$ und $\text{tRNA}_{2\delta}^{\text{Asp}}$.



c) Kochromatographie von [^{14}C]-Histidyl-tRNA aus Flecken 1 (Abb. 1a) mit totaler tRNA, die mit [^3H]-Histidin aminoacyliert war. Flecken 1 enthält somit beide Isoakzeptoren γ und δ .

tRNA	Filter mit je 54 µg DNA			Filter ohne DNA
	14C4 (cpm)	38B10 (cpm)	63H5 (cpm)	
tRNA ^{Arg} ₂	543375	657	6104	161
tRNA ^{Asn}	103311	-	1283	1033
tRNA ^{Asp} ₂ 8	509	545	375538	290
tRNA ^{His} 8	18859	580334	1576	107

Tab. 3: Hybridisierung von gereinigten [¹²⁵I]-tRNA Isoakzeptoren an filtergebundene Plasmiden DNA.

Die Resultate (Tab. 3) bestätigen die bisher erhaltenen Zuordnungen von tRNA Genen.

Die Methode ist also geeignet, um relativ schnell eine vorläufige Charakterisierung von tRNA Plasmiden zu erreichen. Wenn hybridisierende tRNAs in Gelflecken erscheinen, die keine reinen tRNA Spezies darstellen, werden weitere Experimente nötig, um das Plasmid weiter zu charakterisieren. Doch beschränkt sich die Mehrdeutigkeit in diesen Fällen nur auf wenige Alternativen, so dass mit gezielten Experimenten entschieden werden kann, welche zutrifft.

In Tabelle 4 sind die Resultate der Plasmidencharakterisierung zusammengefasst.

Plasmid	hybridisierende tRNAs
14C4	tRNA ^{Asn} , tRNA ^{Arg} ₂
38B10	tRNA ^{His} 8
63H3	tRNA ^{Asp} ₂ 8

Tab. 4: Zusammenstellung der Charakterisierung der Plasmide

2. Vergleich der tRNA Genanordnung in jungen Embryonen und adulten Fliegen

2.1. Isolation von reinen tRNA Isoakzeptoren

Alle Isoakzeptoren, welche für die Hybridisierung mit Southern Transfer Filtern verwendet wurden, wurden mit einer Kombination von Sepharose 4B und RPC-5 Chromatographie mit 2-d PAGE gereinigt. Elutionsprofile von präparativen Sepharose 4B und RPC-5 Chromatographieläufen sind in Abb. 3a und 3c dargestellt. Die Profile sind gut reproduzierbar. Die Peaks wurden einzeln gesammelt und die tRNA Verteilung durch Aminoacylierung bestimmt.

2.1.1. Transfer RNA^{His}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Asp} und tRNA^{Asn}

Für die Isolation dieser tRNAs wurde die Fraktion VII eines Sepharose 4B Laufes (Abb. 3a) mittels 2-d PAGE aufgetrennt (Abb. 3b). Durch Aminoacylierung mit allen 20 Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass Flecken 1 bis 4 (Abb. 3b) reine tRNA Spezies enthielten: tRNA^{His} konnte aus Flecken 1 eluiert werden und mit 1320 pMol/A₂₆₀ Histidin aminoacyliert werden. Mittels RPC-5 Chromatographie konnten diese beiden isogenischen Isoakzeptoren (White et al., 1973) getrennt werden. Für Iodierung und Hybridisierung wurde nur tRNA^{His} verwendet.

Flecken 2 enthielt nur tRNA^{Asn}. Da tRNA^{Asn} auf RPC-5 ein sehr kompliziertes Isoakzeptorenmuster ergibt (Grigliatti et al., 1974), das nicht gut reproduziert werden konnte, konnte der Isoakzeptor nicht eindeutig bestimmt werden. Eine Fingerprintanalyse der [¹²⁵I]-tRNA^{Asn} (Abb. 4a) zeigte jedoch, dass es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um einen reinen Isoakzeptor handelt, da die Anzahl der Verdauungsprodukte etwa den Erwartungen für eine reine iodierte tRNA Spezies entspricht. Der Fingerprint ist demjenigen von tRNA^{Asn}₅₈ (Th. Schmidt, 1980), sehr ähnlich, so dass es sich um diese oder um eine isogenische tRNA handeln könnte. Die isolierte Fraktion konnte mit 1150 pMol/A₂₆₀ aminoacyliert werden.

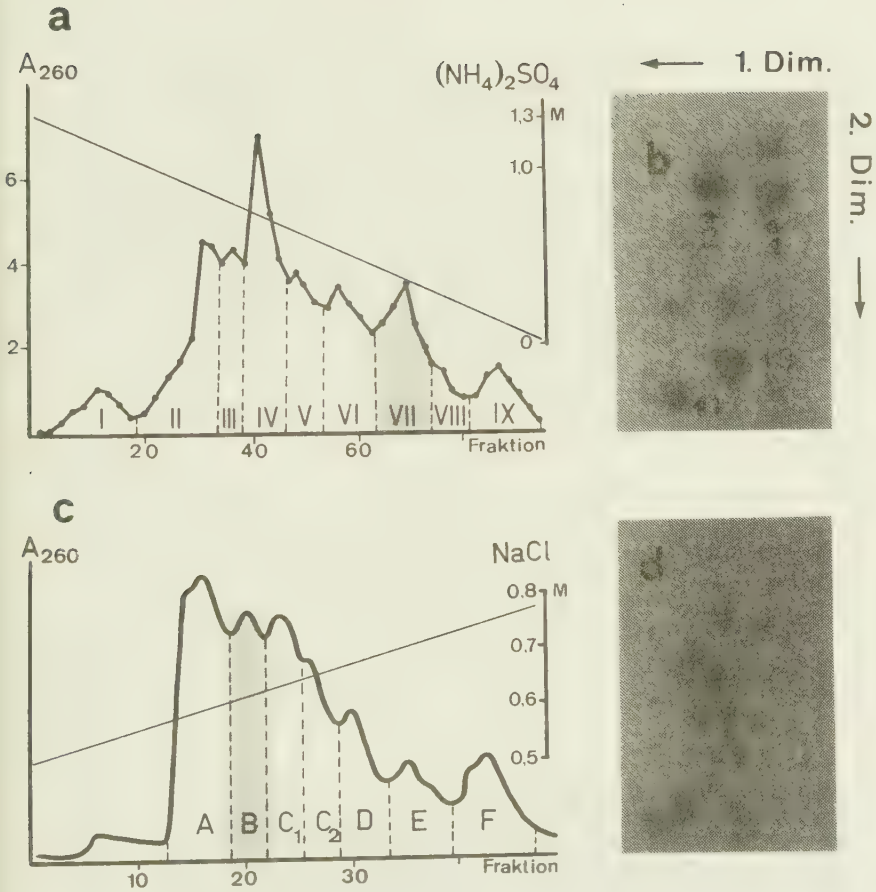


Abb. 3:

- Sepharose 4B Chromatographie von tRNA.
- Zweidimensionale PAGE von tRNA aus Sepharose 4B Peak VII.
Flecken 1: tRNA^{His} ; Flecken 2: tRNA^{Asn} ; Flecken 3: $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$; Flecken 4: $\text{tRNA}_2^{\text{Asp}}$.
- RPC-5 Chromatographie von 150 A_{260} Einheiten tRNA.
- Zweidimensionale PAGE von tRNA aus RPC-5 Peak B.
Der bezeichnete Flecken enthält $\text{tRNA}_4^{\text{Val}}$.

Transfer RNA₂^{Arg} konnte aus Flecken 3 isoliert und mit 1390 pMol/A₂₆₀ Arginin aminoacyliert werden. Mittels RPC-5 Chromatographie wurde der Isoakzeptor bestimmt (Vgl. Abb. 2a).

Transfer RNA_{2~~8/6~~}^{Asp} wurde aus Flecken 4 eluiert. Anschließend wurden die beiden isogenischen Isoakzeptoren γ und δ mittels RPC-5 Chromatographie getrennt (Vgl. Abb. 2b). Für die Iodierung und Hybridisierung wurde nur tRNA_{2~~8~~}^{Asp} verwendet. Es wurde eine Aminoacylierung von 910 pMol/A₂₆₀ erreicht.

2.1.2. Transfer RNA₈^{Tyr}

Transfer RNA^{Tyr} wurde ebenfalls mittels Sepharose 4B und RPC-5 Chromatographie, kombiniert mit PAGE von M. Bienz (1981) isoliert. Eine Fingerprintanalyse von iodierter tRNA₈^{Tyr} (Abb. 4b) sowie erste Sequenzierungsergebnisse (M. Altwegg, persönliche Mitteilung) zeigen, dass dieses Präparat rein ist, soweit das mit diesen Methoden beurteilt werden kann.

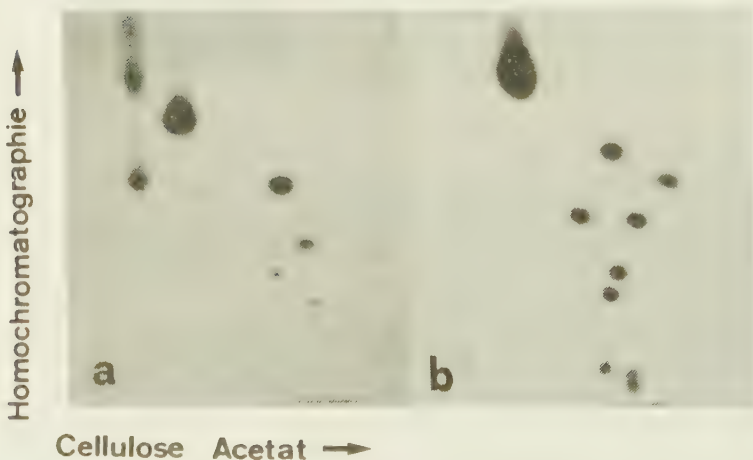


Abb. 4: Pankreatische Fingerprints von [¹²⁵I]-tRNA Proben.

a) tRNA^{Asn}

b) tRNA₈^{Tyr}

2.1.3. Transfer RNA₄^{Val}

Für die Isolation von tRNA₄^{Val} wurde die Fraktion B eines präparativen RPC-5 Laufes (Abb. 3c) mittels 2-d PAGE aufgetrennt (Abb. 3d). Wie durch Aminoacylierung mit allen 20 Aminosäuren gezeigt werden konnte, enthielt der bezeichnete Flecken nur tRNA₄^{Val}. Diese Fraktion konnte mit 1625 pMol/A₂₆₀ Valin beladen werden, was dem theoretisch zu erwartenden Wert für einen reinen tRNA Isoakzeptor entspricht. Mittels RPC-5 Chromatographie wurde gezeigt, dass es sich um tRNA₄^{Val} handelt (Abb. 5).

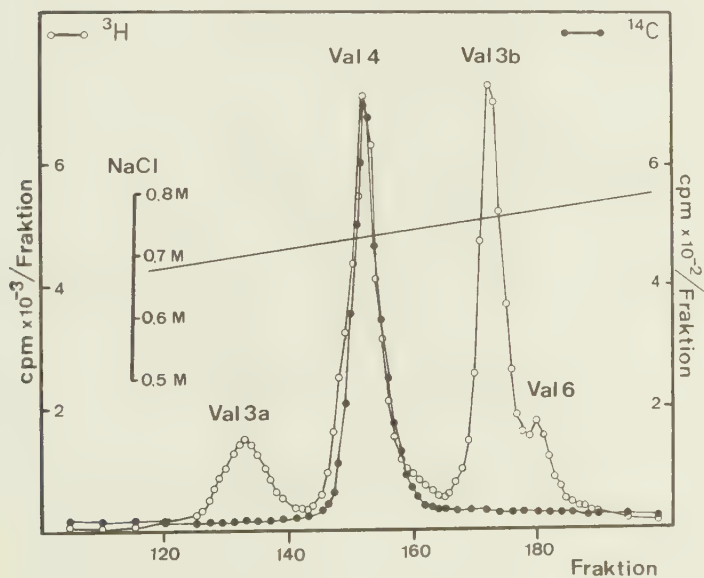


Abb. 5: RPC-5 Chromatographie von [¹⁴C]-Valinyl-tRNA aus dem in Abb. 3d bezeichneten Gelflecken und totaler tRNA, die mit [³H]-Valin aminoacyliert war. Der Flecken enthält den Isoakzeptor tRNA₄^{Val}. Die Chromatographie erfolgte im Formiatpuffersystem.

Dass der theoretisch zu erwartende Aminoacylierungswert für eine reine tRNA Spezies nur in einem Fall erreicht wurde (bei tRNA₄^{Val}), kann mit der Instabilität der Drosophila Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erklärt werden.

2.2. Hybridisierung von tRNA an Southern Transfer Filter

Die gereinigten tRNA Isoakzeptoren wurden mit [¹²⁵I] markiert. Die spezifischen Aktivitäten lagen in allen Fällen zwischen 2×10^8 und 5×10^8 dpm/ μ g.

Eine Schwierigkeit stellte anfänglich der hohe Background über dem Nitrocellulose Filter dar, der die Hybridisierungssignale unterdrückte und von der Menge an Carrier-RNA oder -DNA im Hybridisierungspuffer unabhängig war. Dieses Problem konnte teilweise durch eine Begrenzung der Radioaktivitätskonzentration auf höchstens 10^6 cpm/ml Hybridisierungspuffer gelöst werden. Das Ausmass des Backgrounds über dem Filter schien aber auch reproduzierbar von der Art der [¹²⁵I]-tRNA abhängig zu sein. So ergaben tRNA₄^{Val}, tRNA₈^{Tyr} und tRNA₈^{His} einen sehr geringen Background, tRNA₂^{Arg} einen mässigen, während er bei tRNA₂₈^{Asp} sehr hoch war. Mit tRNA₂₈^{Asn} wurde überhaupt kein brauchbares Autoradiogramm erhalten. Die Ursache für diese Unterschiede im Background bei gleichen Hybridisierungsbedingungen ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen instabile Iodbindungen (andere als in 5-Iodocytosin) dabei eine Rolle.

Sequenzen von tRNA sind zwischen 70 und 80 Nukleotide lang. Deshalb ist die auf ein Moläquivalent bezogene spezifische Aktivität klein verglichen mit einer längeren RNA, die den gleichen Prozentsatz an Iodocytosin aufweist. Es muss deshalb auf eine möglichst effiziente Uebertragung der DNA auf Filter, Hybridisierung und Autoradiographie geachtet werden, um Fragmente mit 1 tRNA Gen sichtbar zu machen. Die Stärke der Hybridisierungssignale konnte wesentlich erhöht werden durch die Wahl eines Nitrocellulose Filters mit 0,1 μ m Porengrösse anstelle eines solchen mit 0,45 μ m Poren.

Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit der Hybridisierungssignal-Stärke von der DNA Menge, die auf dem Nitrocellulose Filter aufgebacken war. Transfer RNA₂^{Arg} wurde an einen Southern Transfer Filter mit 10, 5, 3, 2 und 1 µg Eco R I verdauter Drosophila DNA hybridisiert. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, sind die starken Banden auch bei 1 µg DNA pro Bahn noch zu sehen. Um jedoch auch die schwachen Banden noch zu sehen und um die Intensitäten der einzelnen Banden besser abschätzen zu können, wurden für alle folgenden Experimente 10 µg DNA pro Bahn gewählt.

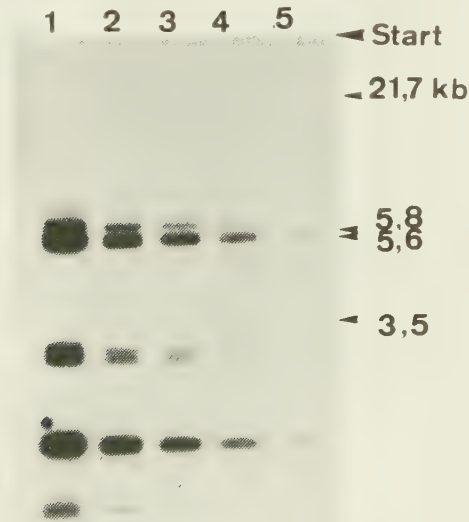


Abb. 6: Hybridisierung von tRNA₂^{Arg} an einen Southern Transfer Filter mit unterschiedlichen Mengen von Eco R I verdauter DNA aus 18 - 22 stündigen Embryonen (Oregon R). R_{ot} -Wert: $0,7 \times 10^{-3}$ Mol sec/l. Bahn 1 = 10 µg DNA; Bahn 2 = 5 µg; Bahn 3 = 3 µg; Bahn 4 = 2 µg; Bahn 5 = 1 µg.

2.2.1. Transfer RNA Gene in Embryonen und Fliegen

Die Resultate der Hybridisierungen der gereinigten tRNA Isoakzeptoren an die Southern Transfer Filter sind in Abb. 7 - 11 dargestellt. Die Autoradiogramme der Filter, die mit tRNA^{His}₄ (Abb. 7), tRNA^{Val}₄ (Abb. 8), tRNA^{Tyr}₄ (Abb. 9) und tRNA^{Asp}₂ (Abb. 10) hybridisiert wurden, zeigen identische Fragmentmuster der DNA aus Embryonen und Fliegen bei Verdauung mit den Restriktionsenzymen Eco R I, Hind III und Bam H I. Die Hybridisierung von tRNA^{Arg}₂ (Abb. 11) führt bei Eco R I Verdauung der beiden DNA Proben ebenfalls zu identischen Mustern, während bei Hind III und Bam H I Verdauung Unterschiede zwischen embryonaler und adulter DNA zu sehen sind. Auf die Bedeutung dieser Unterschiede wird später eingegangen.

Da die Hybridisierungsmuster, mit der erwähnten Ausnahme, identisch sind, ist eine Neuordnung der tRNA Gene im Laufe der Entwicklung vom jungen Embryo zum Adulttier für diese tRNAs auszuschliessen. Ebenfalls kann daraus geschlossen werden, dass diese tRNA Gene in verschiedenen Geweben der Fliege gleich angeordnet sind. Dies gilt mindestens für diejenigen Gewebe, die bei der Extraktion einen wesentlichen Teil der DNA liefern. Dies wiederum impliziert, dass die Anordnung der tRNA Gene in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen, wie sie durch "in situ" Hybridisierungsexperimente aufgezeigt wurde, mit grosser Wahrscheinlichkeit generelle Gültigkeit hat.

In allen Fällen liegen die tRNA Gene auf verschiedenen grossen Verdauungsfragmenten, die bis über 20 kb lang sein können. Dies ist ein Ausdruck des dispersen Verteilungsmusters der tRNA Gene bei *Drosophila*.

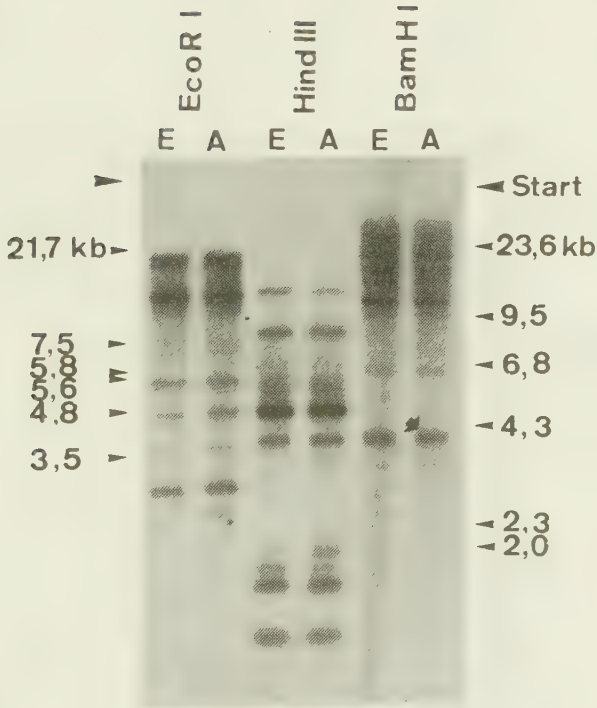


Abb. 7 : Transfer RNA^{His}

Hybridisierung von tRNA^{His} an einen Southern Transfer Filter mit einem R_0 -Wert von $1,6 \times 10^{-3}$ Mol sec/l. Als Molekulargewichtsmarker dienten wie in allen Fällen (Abb. 7 - 12) die Eco R I (links) respektive Hind III (rechts) Fragmente der λ -DNA. Der Pfeil bezeichnet das Bam H I Fragment, das im Plasmiden 38B10 kloniert ist (s. Diskussion).

E = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

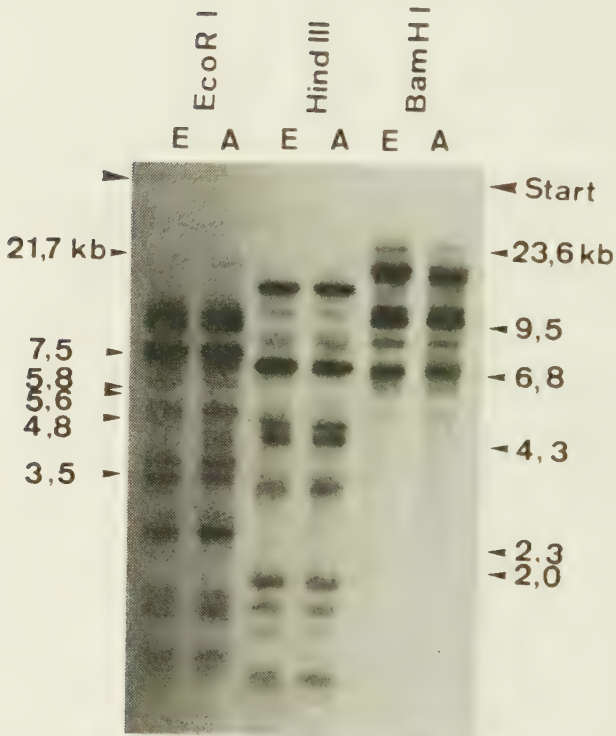


Abb. 8: Transfer RNA₄^{Val}

Hybridisierung von tRNA₄^{Val} an einen Southern Transfer Filter. Der R_0t -Wert betrug 10^{-3} Mol sec/l.

E = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

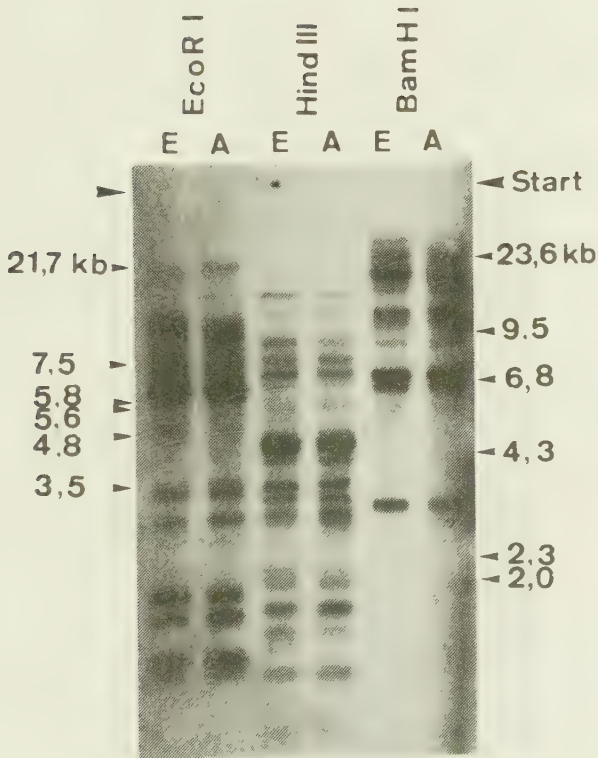


Abb. 9: Transfer RNA^{Tyr}

Hybridisierung von tRNA^{Tyr} an einen Southern Transfer Filter mit einem R_0 -Wert von $1,4 \times 10^{-3}$ Mol sec/l.
 E = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

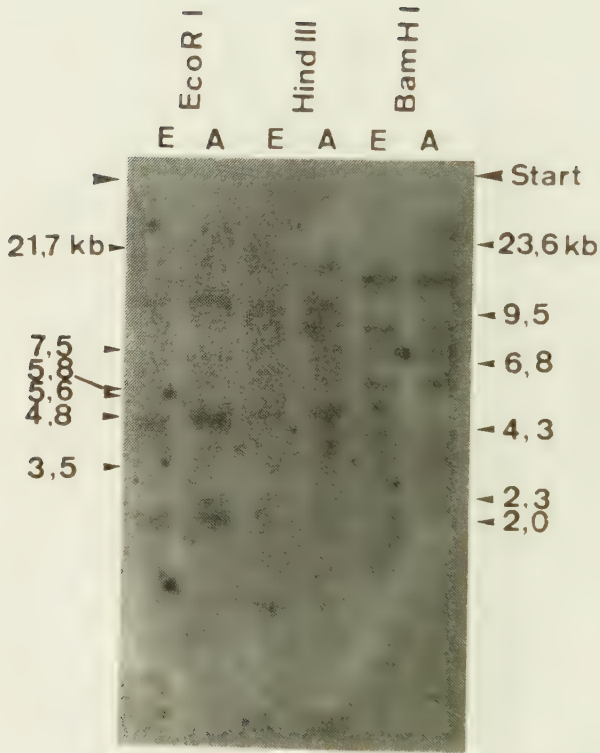


Abb. 10: Transfer RNA $_2^{\text{Asp}}$

Hybridisierung von $\text{tRNA}_2^{\text{Asp}}$ an einen Southern Transfer Filter mit einem R_{ot} -Wert von $0,7 \times 10^{-3}$ Mol sec/l.

E = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

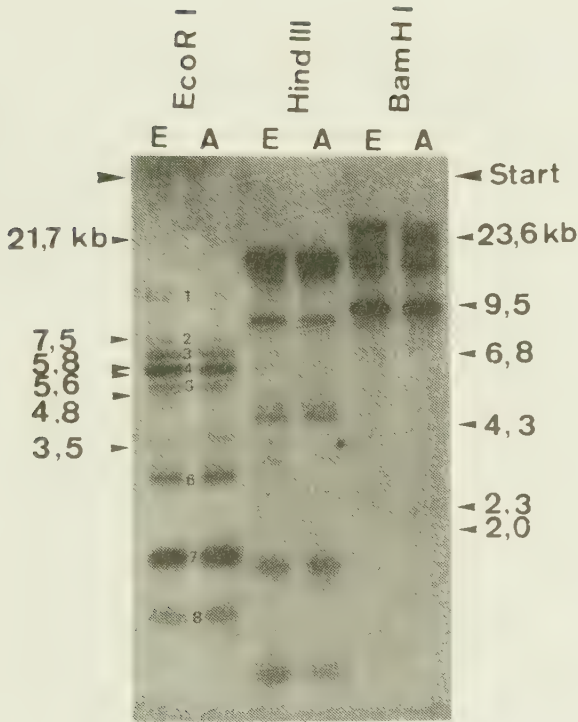


Abb. 11: Transfer RNA₂^{Arg}

Hybridisierung von tRNA₂^{Arg} an einen Southern Transfer Filter mit einem $R_0 t$ -Wert von $0,8 \times 10^{-3}$ Mol sec/l. Die Eco R I Fragmente sind nummeriert (s. Text). Die Grösse der Fragmente wurde graphisch mit einer Eichgeraden bestimmt, die anhand der bekannten Grössen der Eco R I und Hind III Fragmente der λ -DNA erstellt wurde. E = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

2.2.2. Transfer RNA Genzahlen

Es können verschiedene Methoden verwendet werden, um die Anzahl Gene für einen tRNA Isoakzeptor zu bestimmen. Elder et al. (1980) errechneten Genzahlen aus Daten von "in situ" Hybridisierungsexperimenten. Sie erhielten auf diese Weise eine Zahl von 13 tRNA₂^{Arg} Genen. Da bei diesen Berechnungen aber verschiedene nicht genau bekannte Parameter ins Spiel kommen, sind die auf diese Weise ermittelten Genzahlen mit erheblichen Unsicherheiten belastet. Eine andere Methode wendeten Tener et al. (1980) an. Die Autoren hybridisierten tRNA₂^{Lys} an filtergebundene oder gelöste DNA. Sie stellten fest, dass das Sättigungsniveau von der tRNA Konzentration abhängig war, obwohl sie immer im hohen RNA Ueberschuss arbeiteten. Je nach Sättigungsniveau wurden Genzahlen von 4 bis 18 tRNA₂^{Lys} Genen errechnet. Dies zeigt, dass es problematisch ist, mit solchen Experimenten zuverlässige Resultate zu erhalten. In der gleichen Arbeit schätzten diese Autoren tRNA Genzahlen, indem sie die Anzahl hybridisierender Banden auf Southern Transfer Filtern zählten.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit der letztgenannten Methode die Genzahlen der hybridisierten tRNA Isoakzeptoren zu schätzen. Folgende Schwierigkeiten müssen dabei bedacht werden:

- Kontamination eines tRNA Isoakzeptors mit einem anderen kann zu Ueberschätzungen von Genzahlen führen. Um diese Möglichkeit weitgehend auszuschalten, wurde mit niedrigen R_{ot} -Werten hybridisiert, die dem 0,5 bis 1,5-fachen des R_{ot} 1/2 -Wertes entsprachen.
- Kreuzhybridisierungen können ebenfalls zu Ueberschätzungen von Genzahlen führen. So hybridisiert z. B. tRNA^{Asn} mit einem tRNA^{Ile} Gen (Hovemann et al., 1980).
- Gleiche tRNA Gene, die in entgegengesetzter Richtung nahe beieinander liegen, hybridisieren unter Umständen schlecht mit RNA, da sie mit sich selbst renaturieren können (Hovemann et al., 1980).

- Es besteht keine Sicherheit darüber, wieviele Gene ein Restriktionsfragment trägt. Die Intensitätsverhältnisse der Banden auf dem Autoradiogramm wurden densitometrisch bestimmt.

Transfer RNA₂^{Arg} (Abb. 11)

Eco R I Verdauung ergibt 8 Banden von unterschiedlicher Intensität, während Hind III Verdauung in 7 oder 8 Banden resultiert. Wenn angenommen wird, dass die Banden mittlerer Intensität (z. B. Banden Nr. 3, 5, 6 und 8) je 1 tRNA₂^{Arg} Gen enthalten, dann repräsentiert die starke Eco R I Bande Nr. 4 zwei Gene und Bande Nr. 7 drei Gene gemäss den densitometrisch bestimmten Intensitäten. Werden die schwachen Banden Nr. 1 und 2 als je 1 Gen gezählt, erhält man eine Gesamtzahl von 11 tRNA₂^{Arg} Genen. Bei Hind III Verdauung erhält man mit diesem Verfahren 10 bis 11 Gene, da die grössten und stärksten Fragmente die 4-fache (Embryonen) respektive 5-fache (Fliegen) Intensität der übrigen Banden aufweisen. Diese Zahl von 11 tRNA₂^{Arg} Genen ist in guter Uebereinstimmung mit der Zahl von 13 Genen, die von Elder et al. (1980) erhalten wurde.

Da über tRNA₂^{Arg} Gene weitere Informationen erhältlich sind, kann diese Genzahlschätzung zum Teil überprüft werden. Mittels "in situ" Hybridisierung sind tRNA₂^{Arg} Genloci in 2 chromosomalen Regionen bestimmt worden: 42 A und 84 F (Elder et al., 1980; Tener et al., 1980). Das Plasmid 14C4, das in dieser Arbeit charakterisiert wurde und neben tRNA^{Asn} Genen auch Gene für tRNA₂^{Arg} enthält, hybridisiert an 84 F (Dudler et al., 1980). Wird 14C4 mit Eco R I verdaut, hybridisiert tRNA mit 2 Fragmenten von 1,8 kb und 1,2 kb Länge. Totale [³²P]-tRNA hybridisiert an diese beiden Fragmente im Verhältnis 4 (1,8 kb) zu 1 (1,2 kb) (Dudler et al., 1980). Bei Eco R I Verdauung von Genom DNA werden 2 Banden von 1,8 kb (Nr. 7) respektive 1,2 kb (Nr. 8) markiert, wobei das 1,8 kb Fragment etwa die 3-fache Intensität des 1,2 kb Fragmentes aufweist. Daraus kann geschlossen werden, dass diese beiden Fragmente der chromosomalen Region 84 F ent-

stammen und zusammen wahrscheinlich 4 tRNA^{Arg}₂ Gene enthalten, die im Plasmiden 14C4 kloniert sind.

Yen and Davidson (1980) klonierten ca. 94 kb DNA, die aus der Region 42 A stammt. In dieser DNA fanden die Autoren 4 tRNA^{Arg}₂ Gene auf 4 Eco R I Fragmenten von 2,7 kb (Fragment 11 F), 5,8 kb (11 D), 5,9 kb (17 D) und 6,7 kb (35 D) Länge (Vgl. Tab. 5). Diese Fragmente sind auch auf dem Southern Transfer Filter (Abb. 11) zu sehen: Bande Nr. 6 entspricht 11 F (2,7 kb); Bande Nr. 4, welche die doppelte Intensität der übrigen Banden aufweist, entspricht 11 D (5,8 kb) und 17 D (5,9 kb). Diese beiden Fragmente wurden auf dem Gel nicht voneinander getrennt. Bande Nr. 3 entspricht 35 D (6,7 kb). Die erwähnten Banden können also der chromosomalen Region 42 A zugeordnet werden. Banden Nr. 1, 2 und 5 können weder 42 A noch 84 F zugeordnet werden. Sie entstammen einem nicht klonierten Bereich.

Dies bestätigt die oben gemachte Annahme, dass Fragmente, die 1 tRNA^{Arg}₂ Gen enthalten, auf dem Autoradiogramm mit mittlerer Intensität erscheinen. Die Bedeutung der schwachen Banden (Nr. 1 und 2) ist nicht eindeutig. Sie könnten 2 tRNA^{Arg}₂ Gene in "inverted repeat" Konfiguration enthalten. Da aber auch andere Interpretationen möglich sind, wurden sie nur als 1 Gen gezählt.

Die aus dem Southern Transfer Filter abgeleiteten Daten sind also konsistent mit den erhältlichen Informationen von klonierten tRNA^{Arg}₂ Genen. Dies zeigt, dass die so gewonnenen Schätzungen von Genzahlen trotz der oben erwähnten Schwierigkeiten sinnvoll sind. In der Folge wurden auf allen Southern Transfer Filtern die schwachen und mittleren Banden als je 1 Gen gezählt, während die starken Banden mehrfach gezählt wurden, entsprechend ihrer Intensität gegenüber den mittleren Banden (Die Intensitätsverhältnisse wurden densitometrisch bestimmt).

Transfer RNA^{His} (Abb. 7)

In den Eco R I Bahnen sind 10 Banden, in den Hind III Bahnen 11 Banden und in den Bam H I Bahnen 9 oder 10 Banden sichtbar. Unter Berücksichtigung der Intensitätsverhältnisse nach den oben genannten Kriterien wird eine Zahl von etwa 12 tRNA^{His} Genen erhalten. Transfer RNA^{His} wurde von Th. Schmidt (1980) "in situ" bei 48 F und 56 E lokalisiert und von M. Altwegg (1980) sequenziert. Die tRNA Sequenz enthält eine Hind III Erkennungsstelle im TΨCG-Loop. Trotzdem sind auf dem Southern Transfer Filter in den Hind III Bahnen nicht mehr Banden zu finden als bei Eco R I Verdauung. Offenbar hybridisiert nur das eine Bruchstück des Gens effizient genug, und zwar wahrscheinlich die 5'-Hälfte, da der 3'-Teil nur 15 Nukleotide umfasst.

Transfer RNA^{Val}₄ (Abb. 8)

Das Eco R I Muster zeigt etwa 15 Banden, während es in den Hind III Bahnen 12 oder 13 sind. Werden die Intensitätsverhältnisse berücksichtigt, wird eine Zahl von 17 bis 19 tRNA^{Val}₄ Genen erhalten. Diese tRNA wurde an 3 verschiedenen chromosomalen Regionen lokalisiert (56 D, 70 BC und 89 B; Elder et al., 1980). Die hier erhaltenen Muster stimmen mit denjenigen überein, die Tener et al. (1980) publizierten.

Transfer RNA^{Tyr} (Abb. 9)

In den Eco R I und Hind III Bahnen sind ca. 17 bis 20 Banden zum Teil sehr schwach markiert, während es in den Bam H I Bahnen etwa 12 sind. Auffällig ist das Muster, das nach Verdauung mit den ersten beiden Enzymen erhalten wurde, wo eine Reihe von Banden in der Region zwischen 5 kb und 20 kb regelmässige Abstände einnehmen. Unvollständige Verdauung scheint unwahrscheinlich, da die λ-DNA als interne Kontrolle vollständig verdaut war. Werden alle Banden und die Intensitäten berücksichtigt, erhält man eine Zahl von 20 bis 23 tRNA^{Tyr} Genen. Es kann nicht entschieden werden, ob diese

Zahl richtig ist oder ob z. B. Kreuzhybridisierung vorliegt. Letzteres scheint aber durchaus möglich zu sein. Müller und Clarkson (1980) fanden, dass bei *Xenopus laevis* Sequenzen von tRNA^{Tyr} und tRNA^{Phe} zu 70% homolog sind, und zwar in 2 Regionen, die annähernd 100% Homologie aufweisen. Da tRNA Sequenzen in Eukaryonten sehr konservativ sind (Die tRNA₂^{Phe} Sequenz von *Drosophila* weicht nur in 3 Nukleotiden von derjenigen von *Xenopus* ab; Altwegg and Kubli, 1979), sind die Verhältnisse bei *Drosophila* wahrscheinlich ähnlich. Stringentere Hybridisierungsbedingungen (in 2 x SSC statt 5 x SSC in 50% Formamid) ergaben jedoch keine Reduktion der Bandenzahl (nicht dargestellt).

Transfer RNA₂^{Asp} (Abb. 10)

Eco R I Verdauung resultierte in 5 tRNA₂^{Asp} spezifischen Banden von etwa gleicher Intensität, Hind III und Bam H I Verdauung in je 4. Da der starke Background schwache Banden verdeckt, ist eine aus diesen Daten abgeleitete Genzahl von 5 wahrscheinlich ein Minimum.

2.2.3. Unterschiede im tRNA₂^{Arg} spezifischen Restriktionsmuster von DNA aus Embryonen und Fliegen

Als einzige der getesteten tRNAs zeigte tRNA₂^{Arg} bei der Hybridisierung an Southern Transfer Filter Unterschiede in den Hind III und Bam H I spezifischen Restriktionsmustern von DNA aus Embryonen und Fliegen. Das Muster nach Eco R I hingegen war bei beiden DNA Proben identisch.

Die DNA, die in den in Kap. 2.2. beschriebenen Experimenten verwendet wurde, stammte aus Fliegen und Embryonen von 2 verschiedenen Zuchtansätzen. Der genetische Hintergrund der Tiere war möglicherweise nicht identisch. Deshalb wurde das Experiment wiederholt mit Fliegen und Embryonen, die mit Sicherheit identischen genetischen Hintergrund aufwiesen und keine stamm- oder populationspezifischen Differenzen haben konnten. DNA wurde aus Embryonen, die entweder maximal 2 bis 2 1/2 Stunden oder 18 bis 22

Stunden alt waren, und aus deren Eltern (Stamm Oregon R) extrahiert. Die DNA wurde nur mit Eco R I und Bam H I verdaut. Das Resultat des 1. Experimentes wurde bezüglich der Bam H I spezifischen Musteränderung reproduziert (Abb. 12). Dies zeigt, dass diese Musteränderungen im Verlaufe der Ontogenese stattfinden und nicht auf Stammes- oder Populationsunterschieden beruhen.

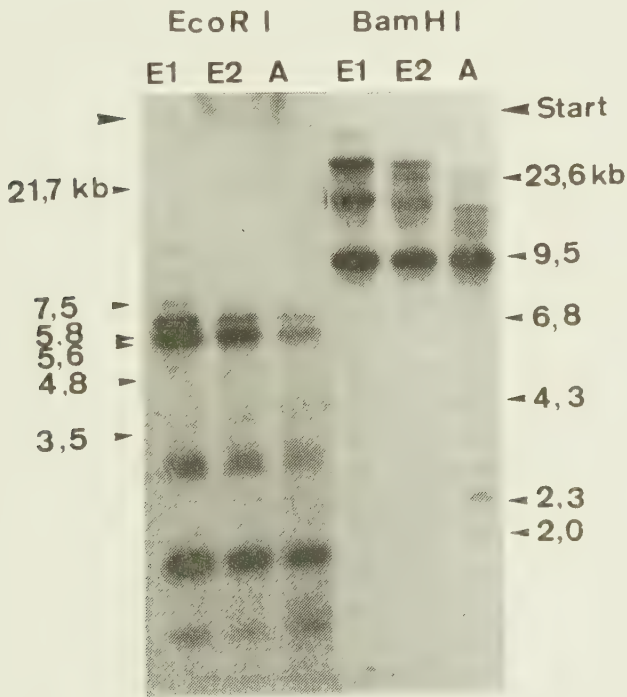


Abb. 12: Transfer RNA₂^{Arg}

Hybridisierung von tRNA₂^{Arg} an einen Southern Transfer Filter mit einem R_{ot} -Wert von $0,7 \times 10^{-3}$ Mol sec/l. E1 = DNA aus 2 - 2 1/2 stündigen Oregon R Embryonen; E2 = DNA aus 18 - 22 stündigen Oregon R Embryonen; A = DNA aus Adulttieren.

Das Bam H I Restriktionsmuster der DNA aus 18 bis 22 stündigen Embryonen ist intermediär verglichen mit dem adulttypischen Muster und demjenigen von jungen Embryonen.

Das Eco R I spezifische Muster ist wie im ersten Experiment bei allen Proben identisch. Allerdings ist in diesem Versuch die Bande Nr. 5 (ca. 5,2 kb) verschwunden, dafür taucht eine neue in der Nähe des Fragmentes 11 F (2,7 kb) auf. Diese Differenz ist auf einen Stammunterschied zurückzuführen (Abb. 11 und 12).

IV. DISKUSSION

1. Plasmidencharakterisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Methode, die im Wesentlichen auf den guten Trenneigenschaften der verwendeten Polyacrylamidgele beruht, die drei rekombinanten Plasmide 14C4, 38B10 und 63H5 charakterisiert. Daten von "in situ" Hybridisierungsexperimenten bestätigen die erhaltenen Ergebnisse: 14C4 hybridisiert an die chromosomale Region 84 F, 38B10 an 48 F und 63H5 an 70 A (Dudler et al., 1980). Die den Plasmiden zugeordneten tRNAs wurden sämtliche in den entsprechenden Regionen lokalisiert: tRNA^{Arg}₂ und tRNA^{Asn} hybridisieren an 84 F, tRNA^{His} an 48 F und tRNA^{Asp}₂ an 70 A (Schmidt and Kubli, 1980; Hayashi et al., 1980, 1981).

Es zeigte sich, dass die Zuordnungen der einzelnen tRNAs insofern zuverlässig waren, als sie durch die Hybridisierung der einzelnen [¹²⁵I]-markierten Isoakzeptoren bestätigt werden konnten. Allerdings hängen die Identifikationen von der Spezifität der Hybridisierungsreaktion ab, d. h. Kreuzhybridisierungen und schlechte Hybridisierungseffizienz können die Resultate beeinträchtigen. So fanden Hovemann et al. (1980), dass tRNA^{Asn} an ein tRNA^{Ile} Gen hybridisierte. Das konnte dadurch erklärt werden, dass 85% der Sequenz dieser beiden tRNAs zu 71% homolog sind. Eine ähnliche Homologie fanden sie zwischen tRNA^{Ile} und tRNA^{Lys}₂: Zwei Regionen dieser tRNAs, die zusammen 66% der Länge ausmachen, sind zu 83% homolog. In der gleichen Arbeit stellten die Autoren fest, dass 2 Gene für tRNA^{Asn} nicht mit ihren komplementären tRNAs hybridisierten. Die beiden Gene sind nahe beieinander auf entgegengesetzten DNA Strängen angeordnet und bilden einen "inverted repeat", was die Hybridisierung mit tRNA offensichtlich verunmöglicht.

Aus diesen Gründen bleiben die mit Hybridisierungsexperimenten erhaltenen Identifikationen von Plasmiden

immer bis zu einem gewissen Grade vorläufig, und erst die Sequenz der DNA ergibt die definitiven Informationen.

Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode ist es möglich, tRNA Gen-tragende Plasmide verhältnismässig schnell und einfach zu charakterisieren. Dies eröffnet die Möglichkeit, einen Ueberblick über die Art der klonierten tRNA Gene zu gewinnen. Interessant erscheinende Plasmide können dann gezielt herausgegriffen und näher analysiert werden.

2. Transfer RNA Genorganisation

Die Hybridisierung von verschiedenen tRNAs an Southern Transfer Filter mit verdauter Genom DNA bestätigen das bisher erhaltene Bild der tRNA Genanordnung. Die tRNA Gene liegen auf Restriktionsfragmenten, die sehr unterschiedliche Grössen aufweisen können, was ein Ausdruck ihrer dispersen Verteilung ist. Die Gene können zwar in Clustern zusammengefasst sein, aber auch innerhalb eines Clusters scheinen sie irregulär angeordnet zu sein.

Ein Beispiel eines grossen Clusters ist derjenige in der chromosomalen Region 42 A. Yen und Davidson (1980) klonierten 94 kb DNA aus dieser Region. In einem zentralen Bereich dieser Region, der ca. 48 kb umfasst, fanden die Autoren 18 tRNA Gene auf beiden DNA Strängen, und zwar 8 tRNA^{Asn} Gene, 4 tRNA^{Arg}₂ Gene, 5 tRNA^{Lys}₂ Gene und 1 Gen für tRNA^{Ile}. Diese Region wird von je ca. 24 kb DNA flankiert, in der keine tRNA Gene gefunden wurden. Alle tRNA^{Arg}₂ Gene dieser Region wurden auf dem Southern Transfer Filter (Abb. 11) auf den entsprechenden Banden gefunden.

Ein anderer Cluster, der ebenfalls Gene für tRNA^{Arg}₂ und tRNA^{Asn} enthält, ist bei 84 F lokalisiert. Ein 18 kb langes Fragment aus dieser Region wurde im Plasmiden 14C4 kloniert (Dudler et al., 1980). Transfer RNA Gene wurden in einem zentralen 2 kb Fragment gefunden. Die Daten von Hybridisierungen der entsprechenden tRNAs an 14C4 und an Southern Transfer Filter lassen vermuten, dass das Plasmid 2 tRNA^{Asn} Gene und 3 bis 4 tRNA^{Arg}₂ Gene enthält (Vgl. Resultate, Kap. 1.2 und 2.2.2.).

Auffallend ist, dass sowohl bei 42 A wie auch bei 84 F Gene für tRNA^{Arg}₂ und tRNA^{Asn} im selben Cluster zu finden sind. Ob diese Tatsache eine funktionelle Ursache hat, ist nicht bekannt.

Eine andere Organisationsart eines Clusters wurde von Hosbach et al. (1980) beschrieben. In 12,6 kb klonierter DNA aus der Region 62 A fanden die Autoren ein Triplet von tRNA^{Glu} Genen, das 0,55 kb umfasst. Drei kb davon entfernt liegt ein 0,45 kb umfassendes Doublet von gleichen Genen. Diese 5 tRNA^{Glu} Gene haben alle dieselbe Polarität und sind mit Ausnahme eines der Gene, das an 1 Stelle eine Basenänderung aufweist, identisch. Die die Gene flankierenden Sequenzen sind zum Teil homolog, was auf eine gemeinsame evolutionäre Herkunft hinweisen könnte. Diese regelmässige Anordnung von gleichen Genen scheint aber eher die Ausnahme zu sein und könnte in einem relativ geringen evolutionären Alter des Clusters beruhen, der aus Duplikationen aus einem ursprünglich einzigen tRNA^{Glu} Gen hervorgegangen sein könnte. Es sind bis heute aber zuwenige Clusters untersucht worden, um ein definitives Bild über die Häufigkeit dieser Organisationsart zu geben.

Gene für tRNA^{His} wurden unter anderem bei 48 F lokalisiert (Schmidt and Kubli, 1980). Ungefähr 7,5 kb DNA wurden aus dieser Region im Plasmiden 38B10 kloniert (Dudler et al., 1980). Da die tRNA^{His} Sequenz eine Hind III Schnittstelle aufweist (Altwegg and Kubli, 1980), und 38B10 nur eine solche Stelle enthält, muss angenommen werden, dass das Plasmid nur 1 tRNA^{His} Gen enthält. Dies stimmt überein mit den Daten der Hybridisierung dieser tRNA an Southern Transfer Filter (Abb. 7). Die codierende Region von 38B10 liegt auf einem ca. 3,8 kb langen Bam H I Fragment. Ein solches Fragment, das auf dem Autoradiogramm eine mittlere Schwärzungsintensität aufweist, ist in Abb. 7 zu sehen (bezeichnete Bande). Die Grösse des entsprechenden Eco R I respektive Hind III Fragmentes ist nicht bekannt, da die relevanten Schnittstellen ausserhalb des klonierten Bereichs liegen.

Das Plasmid 63H5 enthält 2,5 kb DNA aus der chromosomalen Region 70 A und codiert für mindestens 1 tRNA^{Asp}₂ Gen. Weitere tRNA Gene konnten nicht nachgewiesen werden, obwohl durch Hybridisierungsselektion nicht nur tRNA^{Asp}₂ gewonnen wird, sondern in kleinem Masse auch eine Spezies, die sich durch 2-d PAGE davon abtrennen lässt (S. Abb. 1d). Transfer RNA^{Asp}₂ markiert bei "in situ" Hybridisierung hauptsächlich die Region 29 DE und schwächer auch 25 D, 70 A und 96 AB (Schmidt et al., 1978; Hayashi et al., 1980, 1981). Da 70 A nur schwach von tRNA^{Asp}₂ markiert wird und an dieser Stelle bis jetzt keine weiteren tRNAs lokalisiert wurden, scheint es nicht unwahrscheinlich, dass diese Region nur 1 tRNA^{Asp}₂ Gen enthält, zumal das Genom von Drosophila nur eine geringe Zahl dieser Gene zu enthalten scheint (Die Zahl wurde in dieser Arbeit auf mindestens 5 geschätzt). Da die klonierte Region keine Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme aufweist (Dudler et al., 1980), kann nicht gesagt werden, welche Bande auf dem Southern Transfer Filter (Abb. 10) dem klonierten Gen entspricht.

Die Organisation der tRNA Gene bei Drosophila ist sehr verschieden von derjenigen bei Xenopus. Die ca. 7800 tRNA Gene im haploiden Genom von Xenopus laevis teilen sich in 43 verschiedene Sequenzfamilien auf (Clarkson et al., 1973). Das heisst, dass die Gene für eine tRNA Sequenz im Durchschnitt etwa 200-fach reiteriert sind. Der grösste Teil dieser Gene ist in Form von Clustern organisiert, die von identischen oder fast identischen Repetitionseinheiten gebildet werden (Clarkson et al., 1973; Clarkson and Kurer, 1976). Diese Organisation der tRNA Gene in Form von "tandem repeats" würde mindestens theoretisch Crossover Fixation (Smith, 1974) erlauben. Durch die disperse Verteilung der tRNA Gene bei Drosophila und durch die zum Teil entgegengesetzte Polarität gleicher Gene scheint dieser Mechanismus ausgeschlossen zu sein.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Genanordnung für 4 der 5 untersuchten tRNAs in 2 bis 2 1/2 stündigen Embryonen gleich ist wie in adulten Fliegen (tRNA^{Arg}₂ wird

später diskutiert). DNA aus Embryonen dieses Alters ist zwar keine Keimbahn DNA, doch sind die Zellkerne aus allen Regionen des Embryos zu diesem Zeitpunkt, und auch später noch bis zum frühen Gastrulastadium (ca. 3 1/2 h) omnipotent, wie Illmensee (1972, 1973) mit Kerntransplantationsexperimenten zeigte. Die Kerne sind also nicht determiniert, mindestens nicht irreversibel. Die Möglichkeit, dass eventuelle Sequenztranslokationen reversibel sind oder keinen Einfluss auf den Determinationszustand einer Zelle haben, ist nicht auszuschliessen, scheint jedoch unwahrscheinlich. Wenn angenommen wird, dass die tRNA Gene in allen Entwicklungsstadien und Geweben gleich angeordnet sind und damit Crossover Fixation als Korrekturmechanismus zur Konstanzhaltung der redundanten tRNA Gene ausgeschlossen wird, bleiben 2 Möglichkeiten: Zum einen könnte ein unbekannter Korrekturmechanismus auf die tRNA Gene wirken unabhängig von ihrer Anordnung. Zum andern wäre die Sequenzkonstanz allein durch Selektion zu erklären. Der Selektionsdruck könnte auf jedes der redundanten Gene genügend gross sein, vor allem dann, wenn angenommen wird, dass diese Gene nicht gemeinsam reguliert werden, sondern stadien- und gewebsspezifisch aktiv sind. Tatsächlich wurde bei *Bombyx mori* ein gewebespezifischer tRNA^{Ala} Isoakzeptor in der Seidendrüse nachgewiesen (Sprague et al., 1977). Bei *Drosophila* ist darüber nichts bekannt.

Finnegan et al. (1978) diskutieren mögliche Gründe und Eigenschaften für die beiden Anordnungstypen von repetitiven Genen: Organisation in "tandem repeats" und disperse Verteilung. Redundanz von Genen könnte zwei Gründe haben: Der eine wäre die Erfordernis einer hohen Syntheserate von Transkriptionsprodukten. Die Autoren nennen diesen Fall "Gendosis-Repetition". Zum andern können repetitive Gene potentiell durch eine Vielzahl von verschiedenen Kontrollmechanismen reguliert werden. Die Autoren sprechen in diesem Fall von "Regulationsrepetition". Einzelne Gene könnten bei diesem Modus individuell reguliert werden. Die Organisation von redundanten Genen in "tandem repeats" würde dem Modus der "Gendosisrepetition" entsprechen. Mindestens ein Teil der

Gene würden in diesem Fall kollektiv reguliert. Es sprechen einige Gründe dafür, dass die Gene für 5S, 28S und 18S rRNA Beispiele für die "Gendosisrepetition" sind. Auch die tRNA Gene von *Xenopus* könnten in diese Gruppe gehören (in der *Xenopus* Oocyte muss die grosse Menge von 40 ng tRNA synthetisiert werden; Clarkson et al., 1973). "Unequal" Crossover und Crossover Fixation könnten als Korrekturmechanismus auf Gene dieses Anordnungstyps wirken.

Dispers verteilte repetitive Gene wie z. B. die Copia-ähnlichen Gene (Dunsmuir et al., 1980) könnten dem Typ der "Regulationsrepetition" angehören. Auch die tRNA Gene von *Drosophila* könnten vom Organisationstyp her in diese Gruppe passen. Ein Charakteristikum von Genen dieses Typs ist es, dass die flankierenden Sequenzen der redundanten Gene verschieden sind, was gut in das Modell der individuellen Regulierbarkeit passen würde. De Franco et al. (1980) zeigten, dass verschiedene Sequenzen an der 5'-Seite von 2 identischen tRNA^{Lys} Genen von *Drosophila* einen stark modulierenden Einfluss auf die Transkriptionsrate dieser Gene haben, wenn diese im *Xenopus* Oocyten-Extrakt "in vitro" transkribiert werden. Ob diese differentiellen Genaktivitäten "in vivo" ebenfalls vorkommen, ist heute nicht bekannt. Transfer RNA Suppressor-mutanten könnten darüber Auskunft geben. Bei einer stadien- und gewebespezifischen Aktivität der tRNA Gene würde auf den einzelnen repetitiven Genen ein starker Selektionsdruck lasten, der vielleicht genügt, um die Konstanz zu erhalten.

3. Transfer RNA Genzahlen.

Die von Weber und Berger (1976) ermittelte Zahl von 590 tRNA Genen, die sich in 59 Sequenzfamilien aufteilen, ergibt eine durchschnittliche Anzahl von 10 Genen für eine tRNA Sequenz. Obwohl bei diesen Hybridisierungsexperimenten kleine Sequenzunterschiede nicht entdeckt wurden, schienen erste Ergebnisse von klonierten und sequenzierten tRNA Genen auf eine strikte Homogenität der redundanten Gene hinzuweisen: Drei tRNA^{Lys}₂ Gene und drei tRNA^{Asn} Gene wiesen je iden-

tische Sequenzen auf (Hovemann et al., 1980). Inzwischen wurde hingegen immer mehr Information akkumuliert, die darauf hinweist, dass eine Zahl von 10 Genen für eine tRNA Sequenz zu hoch sein könnte: So unterscheiden sich die von Hosbach et al. (1980) klonierten tRNA^{Glu} Gene von tRNA^{Glu}₄, mit der diese Gene hybridisieren, in 6 Nukleotiden (Altwegg and Kubli, 1980). Sharp et al. (1981) fanden auf einem rekombinanten Plasmiden eine ganze Reihe von tRNA^{Met} Gen-Bruchstücken. Da sich die Bruchstücke teilweise überlappen, handelt es sich dabei jedoch kaum um Gene, die durch Introns unterbrochen sind. Die Bruchstücke hybridisieren mit tRNA^{Met}. Weiter wurden 3 tRNA^{Lys} Gene gefunden, wovon sich eines in 3 Nukleotiden von den andern unterscheidet (De Franco et al., 1981). Solche Unterschiede treten bei den angewandten Hybridisierungsbedingungen nicht zu Tage. Es scheint deshalb durchaus möglich, dass eine durchschnittliche Zahl von 10 tRNA Genen für eine tRNA Sequenz zu hoch ist. Falls dies tatsächlich zutrifft, würde die Möglichkeit der Konservierung von tRNA Sequenzen durch die Selektion allein noch plausibler. Entgegengesetzte Argumente existieren aber auch. So kann die Anordnung von identischen tRNA Genen in "inverted repeat" Konfiguration die Hybridisierung mit tRNA erschweren oder verhindern (Hovemann et al., 1980; Yen and Davidson, 1980). Die Gesamtzahl von tRNA Genen könnte somit höher als 590 bis 750 sein (Weber and Berger, 1976; Ritossa et al., 1966), falls eine solche Anordnung häufig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl Gene für tRNA^{Arg}₂, tRNA^{Val}₄, tRNA^{Tyr}, tRNA^{His} und tRNA^{Asp}₂ anhand der Zahl und Intensität der komplementären Restriktionsfragmente auf Southern Transfer Filtern geschätzt. Aus den oben und im Resultateteil erwähnten Gründen ist es schwierig zu sagen, ob die erhaltenen Zahlen zu hoch oder zu niedrig sind. Trotzdem scheint die angewandte Methode die zuverlässigsten zur Zeit erhältlichen Zahlen zu liefern, da "in situ" und Sättigungs- Hybridisierungsexperimente mit noch grösseren Unsicherheiten behaftet sind (Elder et al., 1980; Tener et al., 1980).

Ueber die Funktionsfähigkeit der tRNA Gene sagen weder Hybridisierungsexperimente noch Sequenzen etwas aus. Die Frage, ob alle diese tRNA Gene, die sich zum Teil nur in wenigen Nukleotiden voneinander unterscheiden, funktionell sind, scheint durchaus berechtigt, da die entsprechenden RNAs nur in wenigen Fällen im Cytoplasma nachgewiesen sind. Zum Beispiel fand D. Söll (persönliche Mitteilung) ein kloniertes $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ Gen, dessen dem Anticodon-Loop angrenzendes G-C Basenpaar durch eine G-T Transversion zerstört ist. Da alle bis heute bekannten cytoplasmatischen Initiator-tRNAs im Anticodonstamm drei G-C Basenpaare aufweisen, die unmittelbar an den Anticodon-Loop anschliessen, wäre das Genprodukt des erwähnten Genes, falls es überhaupt gebildet wird, mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht funktionell. Definitive Antworten auf die Frage nach der "in vivo" Funktionsfähigkeit von Genprodukten können nur Mutanten geben (Vgl. Olson et al., 1979).

4. Bedeutung der Unterschiede im Restriktionsmuster von DNA aus Embryonen und Fliegen

Für die Veränderungen im Hind III und Bam H I Restriktionsmuster (Abb. 11 und 12) gibt es einige Erklärungsmöglichkeiten. Einmal könnten Translokationen von DNA Sequenzen die Ursache bilden. Eine andere Möglichkeit wäre eine unterschiedliche Sensitivität der DNA an spezifischen Stellen gegenüber endogenen DNasen, die z. B. während der Präparation der Zellkerne auf das Chromatin wirken könnten. Ein Gewinn oder Verlust von Hind III und Bam H I Schnittstellen aufgrund von Änderungen in der Basenmodifikation scheint höchst unwahrscheinlich. In Eukaryonten wird als einzige methylierte Base 5-Methylcytosin gefunden, und zwar fast ausschliesslich in der Sequenz CpG (Daskocil und Sorm, 1962). CpG Sequenzen kommen jedoch in den Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme nicht vor.

Die Musterveränderungen betreffen Fragmente, die $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gene enthalten. Da viele dieser Gene kloniert sind, kann versucht werden, ob ein bestimmtes $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gen identifiziert werden kann, das diese Musterveränderungen sichtbar macht. Dazu wurden die Restriktionskarten von 14C4 (Dudler et al., 1980) und der klonierten Region von 42 A (Yen and Davidson, 1980) verwendet.

Die $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gene, die im Plasmiden 14C4 kloniert sind und aus der chromosomalen Region 84 F stammen, konnten den Eco R I Banden 7 und 8 zugeordnet werden (Resultateteil, Kap. 2.2.2., Abb. 11). Bei Hind III Verdauung müssen alle diese Gene auf einem einzigen Fragment liegen, das grösser als 9,5 kb sein muss. Die genaue Grösse kann nicht angegeben werden, da das Plasmid 14C4 nur 1 Hind III Schnittstelle enthält und die 2. ausserhalb des klonierten Bereiches liegen muss. Eine sehr stark markierte Bande im Bereich zwischen 10 und 20 kb ist auf dem Southern Transfer Filter zu sehen. Bei Bam H I Verdauung liegen diese Gene ebenfalls auf einem einzigen Fragment von ca. 9,2 kb, das auf dem Autoradiogramm tatsächlich gefunden wird und eine starke Schwärzungsintensität aufweist (Abb. 11). Da diese Banden identisch sind in den DNAs von Embryonen und Adulten bei allen verwendeten Restriktionsenzymen, betreffen die Musteränderungen nicht die erfassbare Region von 84 F.

Die $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gene, die aus der chromosomalen Region 42 A stammen und von Yen and Davidson (1980) kloniert wurden, liegen auf Restriktionsfragmenten, die in Tab. 5 zusammengestellt sind. Aus den in dieser Tabelle zusammengestellten Daten lässt sich ableiten, dass es von den klonierten $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Genen nicht diejenigen auf den Fragmenten 11 F und 11 D sind, die Musterveränderung sichtbar machen, da diese beiden Gene auch bei Hind III Verdauung auf Fragmenten liegen, die in den DNAs von Embryonen und Adulten gleich gross sind (1,5 kb resp. 0,5 kb; Abb. 11 und Tab. 5). Das $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gen, das auf dem Eco R I Fragment 35 D liegt, sollte ein 8,5 kb Hind III Fragment und ein

Chrom. Region	Banden Nr. auf R I* Bahnen in Abb. 11	F I* Fragmente nach Yen and Davidson	H 3* Fragmente nach Yen and Davidson	H 3* Fragment in Abb. 11	B* Fragment nach Yen and Davidson (kb)	B* Fragment in Abb. 11
41 A	6 4 4 3	11 F 2,7 kb → 11 I 5,8 kb → 17 I 5,9 kb → 35 I 6,7 kb →	1,5 kb 0,5 kb 5,3 kb 8,5 kb	unverändert unverändert nicht vorhanden unverändert →	30 kb 16,7 kb	verändert vorhanden (?)
44 F	7 8	1,8 kb 1,2 kb	>9,5 kb	unverändert	9,2 kb	unverändert
?	1 2 5	>10 kb ca.7,5 kb ca.5,2 kb				

Tab. 5: Zusammenstellung der $\text{rPNA}_2^{\text{Arg}}$ spezifischen Restriktionsfragmente gemäss den Restriktionskarten der klonierten Regionen von 84 F (Dudler et al., 1980) und 42 A (Yen and Davidson, 1980).

* R I = Eco R I; H 3 = Hind III; B = Bam H I.

16,7 kb Bam H I Fragment markieren. Das 8,5 kb Hind III Fragment ist in Abb. 11 sehr gut zu sehen und in beiden DNA Proben identisch. Ein konstantes Bam H I Fragment dieser Grössenordnung ist in allen DNA Proben möglicherweise vorhanden (Abb. 11, 12), doch können auf diesen Gelen Molekulargewichte in dieser Region nicht mehr genau geschätzt werden.

Das tRNA₂^{Arg} Gen auf dem Eco R I Fragment 17 D sollte auf einem 5,3 kb Hind III Fragment und einem 30 kb Bam H I Fragment liegen. Ein Hind III Fragment von 5,3 kb ist auf dem Southern blot (Abb. 11) nicht zu finden, und Bam H I Fragmente dieser Grössenordnung zeigen Unterschiede zwischen DNA aus Embryonen und Adulten (Abb. 11 und 12). Wenn es eines der klonierten tRNA₂^{Arg} Gene ist, das die Musterveränderung sichtbar macht, so kommt aus den oben genannten Gründen nur dasjenige auf dem Eco R I Fragment 17 D in Frage. Natürlich sind die Daten auch konsistent mit der Annahme, dass es sich dabei um ein Gen ausserhalb der klonierten Bereiche handelt. Folgende Tatsachen lassen aber die Möglichkeit, dass es das Gen auf 17 D ist, das die Musterveränderung verfolgt, interessant erscheinen.

Yen and Davidson (1980) testeten die Eco R I Fragmente der klonierten Region von 42 A auf das Vorhandensein von repetitiven und von transkribierten Sequenzen. Allein das Fragment 12 C (Oregon R) resp. 17 F (entsprechendes Fragment im Canton S Stamm) enthält repetitive Sequenzen. 12 C enthält hochrepetitive Sequenzen und ist um 250 bp länger als 17 F (1,2 kb), welches nur mittelrepetitive Sequenzen enthält. Die Autoren hybridisierten cDNA von poly A⁺ RNA an diese beiden Fragmente. 12 C hybridisierte sehr stark, 17 F nur wenig, was darauf schliessen liess, dass die 250 bp, um die 12 C länger als 17 F ist, zu einer abundant transkribierten repetitiven Sequenzfamilie gehören. Die vorhandenen Daten (Abb. 11 und 12, Tab. 5) deuten darauf hin, dass die gefundenen Unterschiede im tRNA₂^{Arg} spezifischen Restriktionsfragmentmuster der beiden DNA Proben genau dieses Fragment 12 C betreffen, bzw. dem

Fragment, das im Fliegenstamm, der in dieser Arbeit verwendet wurde, dem Fragment 12 C entspricht. Bei Eco R I Verdauung wird dieses Fragment vom $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gen auf 17 D losgekoppelt, ist also nicht markiert. Im Eco R I Muster sind auch keine Unterschiede zwischen der DNA aus Embryonen und Adulten festzustellen (Abb. 11 und 12). Hingegen liegt das Fragment 12 C (resp. 17 F) zusammen mit dem $\text{tRNA}_2^{\text{Arg}}$ Gen auf einem Hind III und Bam H I Fragment, d.h. Veränderungen im Bereich von 12 C würden mit diesen beiden Restriktionsenzymen sichtbar gemacht. Auf dem Southern blot (Abb. 11 und 12) fehlt das 5,3 kb Hind III Fragment, und Bam H I Fragmente der fraglichen Grösse (30 kb) zeigen Veränderungen.

Die erhältlichen Daten sind also konsistent mit der Hypothese, dass die Veränderungen dasjenige Fragment betreffen, das im hier verwendeten Fliegenstamm dem Fragment 12 C resp. 17 F von Yen and Davidson (1980) entspricht. Dieses Fragment scheint grösser zu sein als 12 C, da in der Hind III Verdauung die veränderlichen Banden zwischen 10 und 20 kb lang sind.

Es wäre interessant zu wissen, ob transponierbare Elemente wie Copia oder Copia-ähnliche Sequenzen in die in dieser Arbeit aufgezeigten Veränderungen involviert sind. Diese Gene sind repetitiv, werden abundant transkribiert und sind in vielen Details der Struktur und Integration den bakteriellen Transposons und dem Ty I Element von *S. cerevisiae* ähnlich (Potter et al., 1979; Strobel et al., 1979; Dunsmuir et al., 1980; Levis et al., 1980; Farabaugh and Fink, 1980; Gafner and Philippsen, 1980). Diese Sequenzen wären Kandidaten sowohl für eventuelle Sequenztranspositionen wie auch für die Ursache von Unterschieden in der Sensitivität des Chromatins an spezifischen Stellen gegenüber endogenen Nukleasen, falls die Musterveränderungen darauf beruhen. Die unterschiedliche Sensitivität dieser Chromatinstelle könnte von der Transkriptionsaktivität von Genen in dieser Region abhängen.

Tatsächlich hybridisiert ein Plasmid, das zu einem transponierbaren Element homologe Sequenzen enthält (Copia), unter anderem an die chromosomale Region 42 A (Gehring and Paro, 1980). Doch sind "in situ" Lokalisationen zu ungenau, um eine exakte Korrelation zuzulassen.

Die Musterveränderungen könnten aber auch durch eine unterschiedliche DNase Aktivität hervorgerufen worden sein. In diesem Fall wäre das Chromatin an der spezifischen Stelle hypersensitiv verglichen mit anderen Stellen, aber in allen Stadien gleich stark. Tatsächlich erwies sich eine sorgfältige Reinigung der Zellkerne als wichtig, um hochmolekulare DNA aus Fliegen zu erhalten, während Degradation von DNA während der Extraktion aus Embryonen kein Problem war. Dies weist auf einen höheren DNase Gehalt in Fliegen hin. Die Tatsache, dass 18 bis 22 stündige Embryonen ein intermediäres Muster aufweisen, liesse sich gut mit einem intermediären DNase Gehalt erklären.

Es ist nicht möglich, mit den erhaltenen Daten zu entscheiden, welche der oben genannten Möglichkeiten zutrifft, obwohl spezifische DNase Schnitte als Ursache für die Musterveränderungen wahrscheinlicher scheinen als Sequenztranspositionen, da die Musteränderungen zu komplex sind, um mit einem einzigen Transpositionseignis erklärt werden zu können. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die vorgeschlagene Stelle tatsächlich in die Musteränderungen involviert ist und worauf diese beruhen. Dazu muss versucht werden, die DNA so zu isolieren, dass sie vor eventuellen DNase Aktivitäten geschützt werden kann. Da die fragliche Region von 42 kloniert ist, kann mit den relevanten Restriktionsfragmenten als Hybridisierungsproben überprüft werden, ob die Musterveränderungen die Ursache in der vorgeschlagenen Region haben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Methode ausgearbeitet, welche eine rasche Charakterisierung von klonierten tRNA Genen erlaubt. Durch die Analyse der tRNAs, die an klonierte Gene hybridisiert, kann bestimmt werden, für welche tRNAs die Klone codieren.

Die drei rekombinanten Plasmide 14C4, 38B10 und 63H5, die tRNA Gen-tragende DNA Abschnitte von *Drosophila melanogaster* enthielten, wurden mit dieser Methode charakterisiert: 14C4 trägt Gene für tRNA₂^{Arg} und tRNA^{Asn}, 38B10 codiert für tRNA^{His} und 63H5 enthält codierende Sequenzen für tRNA₂^{Asp}.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die tRNA Genanordnung im frühembryonalen und im Adultstadium von *Drosophila melanogaster* verglichen. Dazu wurden mehrere tRNA Isoakzeptoren isoliert und mit [¹²⁵I] markiert. Sie wurden an Southern Transfer Filter hybridisiert, die restringierte Genom DNA von 2 - 2 1/2 stündigen Embryonen und adulten Fliegen trugen. Ein Vergleich der tRNA spezifischen Restriktionsfragmentmuster der beiden DNA Proben ergab für tRNA^{His}, tRNA₄^{Val}, tRNA^{Tyr} und tRNA₂^{Asp} keine Unterschiede. Daraus wurde geschlossen, dass die Anordnung der Gene dieser tRNAs in den beiden DNA Proben gleich ist.

Die Hybridisierung von tRNA₂^{Arg} hingegen ergab Unterschiede im Restriktionsfragmentmuster von DNA aus Embryonen und Fliegen. Es konnte ein möglicher Ort in der chromosomalen Region 42 A abgeleitet werden, an dem die Ereignisse, die zu den Musteränderungen führen, stattfinden. Bedeutung und Ursachen dieser Musteränderungen werden diskutiert.

Anhand der Anzahl und Intensität der zu den tRNAs komplementären Restriktionsfragmente wurden Genzahlen für die entsprechenden tRNAs geschätzt. Das haploide Genom enthält demnach 11 Gene für tRNA₂^{Arg}, 12 Gene für tRNA^{His}, 17-19 Gene für tRNA₄^{Val}, 20-23 Gene für tRNA^{Tyr} und mindestens 5 Gene für tRNA₂^{Asp}.

VI. A B K U E R Z U N G E N U N D D E F I N I T I O N E N

RNA	=	Ribonukleinsäure
tRNA	=	Transfer Ribonukleinsäure
rRNA	=	ribosomale Ribonukleinsäure
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	=	Aethylendiamintetraessigsäure
DEAE	=	Diäthylaminoäthan
2-d PAGE	=	zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese
RPC	=	reversed phase chromatography
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
kb	=	Kilobase (= 1000 Basen)
A ₂₆₀	=	Absorption bei 260 nm. 1 A ₂₆₀ Einheit = 40 ug RNA = 50 ug DNA

Asn	=	Asparagin	Asp	=	Asparaginsäure
Arg	=	Arginin	Ala	=	Alanin
Glu	=	Glutaminsäure	His	=	Histidin
Ile	=	Isoleucin	Lys	=	Lysin
Phe	=	Phenylalanin	Pro	=	Prolin
Met	=	Methionin	Ser	=	Serin
Tyr	=	Tyrosin	Val	=	Valin

tRNA Basissequenz = tRNA Primärstruktur ohne die Modifikationen der Nukleotide.

Isoakzeptor = tRNA, die mit physikalischen und chemischen Methoden von andern zu unterscheiden ist. Mehrere Isoakzeptoren können dieselbe Basissequenz haben, wenn sie sich nur durch Nukleotidmodifikationen voneinander unterscheiden.

tRNA Spezies = Gesamtheit der Isoakzeptoren, die mit derselben Aminosäure aminoacyliert werden können

isogenische tRNAs = Isoakzeptoren mit derselben Basissequenz. Sie werden von denselben Genen codiert.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Altwegg, M. und Kubli, E.: The nucleotide sequence of glutamate tRNA₄ of *Drosophila melanogaster*. Nucl. Acids Res. 8, 215-223 (1980).
- Altwegg, M. und Kubli, E.: The nucleotide sequence of histidine tRNA₄ of *Drosophila melanogaster*. Nucl. Acids Res. 8, 3259-3262 (1980).
- Altwegg, M.: Transfer RNA von *Drosophila melanogaster*: Ein Beitrag zur Struktur und Evolution. Dissertation, Universität Zürich, (1980).
- Artavanis-Tsakonas, S., Schedl, P., Tschudi, C., Pirodda, V. and Gehring, W.: The 5S genes of *Drosophila melanogaster*. Cell 12, 1057-1067, (1977).
- Bienz, M.: Dissertation, Universität Zürich, (1981), in Vorbereitung.
- Blatt, B. and Feldmann, H.: Characterization of precursors to tRNA in yeast. FEBS Letters 37, 129-133 (1973).
- Brownlee, G.G.: Determination of sequences in RNA. Amsterdam-London, North-Holland Publishing Company, (1972).
- Callan, H.G.: The organization of genetic units in chromosomes. J. Cell. Sci. 2, 1-7, (1967).
- Clarkson, S.G., Birnstiel, M.L., and Serra, V.: Reiterated transfer RNA genes in *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol. 79, 391-410, (1973).
- Clarkson, S.G., Birnstiel, M.L., and Purdom, I.F.: Clustering of transfer RNA genes of *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol. 79, 411-429, (1973).
- Clarkson S.G. and Kurer, V.: Isolation and some properties of DNA coding for tRNA^{Met}₁ from *Xenopus laevis*. Cell 8, 183-195, (1976).
- De Franco, D., Schmidt, O., and Söll, D.: Two control regions for eukaryotic tRNA gene transcription. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 3365-3368, (1980).
- De Franco D., Miller, R., Hayashi, F., Tener, G., and Söll, D.: The genes for Lysine tRNA 5 in *Drosophila*. (1981), in Vorbereitung.

- Dickinson, D.G. and Baker, R.F.: Evidence for translocation of DNA sequences during sea urchin embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5627-5630, (1978).
- Doskocil, J. and Sorm, F.: Distribution of 5-methylcytosine in pyrimidine sequences of deoxyribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 953-959, (1962).
- Dudler, R.: Isolation von Isoakzeptoren der Glycin-Transfer-Ribonukleinsäure von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Zürich, (1977).
- Dudler, R., Egg, A.H., Kubli, E., Artavanis-Tsakonas, S., Gehring, W.J., Steward, R., and Schedl, P.: Transfer RNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* 8, 2921-2937, (1980).
- Dunn, R., Addison, W.R., Gillam, I.C. and Tener, G.M.: The purification of valine tRNAs of *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Biochem.* 56, 618-623, (1978).
- Dunsmuir, P., Brorein, W.J., Simon, M.A. and Rubin, G.M.: Insertion of the *Drosophila* transposable element copia generates a 5 base pair duplication. *Cell* 21, 575-579, (1980).
- Edelman, G.M. and Gally, J.A.: Arrangement and evolution of eukaryotic genes, in: *The Neurosciences*. G.C. Quarton, T. Melnechuk and G. Adelman (editors), Rockefeller University Press, New York, (1970).
- Egg, H.A.: Eine vergleichende Analyse der tRNA und 5S RNA bei der Letalmutante l(3)tr und dem Wildtyp von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich, (1978).
- Elder, R.T., Szabo, P. and Uhlenbeck, O.: 4S RNA gene organization in *Drosophila melanogaster*. In: *Transfer RNA*. J. Abelson, P.R. Schimmel, D. Söll (editors), Cold Spring Harbor Laboratory, (1980).
- Fedoroff, N.V.: On spacers. *Cell* 16, 697-710, (1979).
- Finnegan, D.J., Rubin, G.M., Young, M.W., and Hogness, D.S.: Repeated gene families in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 1053-1063, (1978).
- Farabaugh, P.J. and Fink, G.R.: Insertion of the eucaryotic transposable element Ty 1 creates a 5 base pair duplication. *Nature* 286, 352-356, (1980).
- Gafner, J. and Philippsen, P.: Common features of transposition - a yeast transposon also generates duplications of the target sequence. *Nature* 286, 414-418, (1980).

- Gehring, W.J. and Paro, R.: Isolation of a hybrid plasmid with homologous sequences to a transposing element of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 19, 897-904, (1980).
- Glover, D.M. and Hogness, D.S.: A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of *Drosophila melanogaster* rDNA. *Cell* 10, 167-176, (1977).
- Grigliatti, T.A., White, B.N., Tener, G.M., Kaufman, T.C. and Suzuki, D.T.: Studies on the transfer RNA genes of *Drosophila* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 461-474, (1974).
- Grunstein, M. and Hogness, D.S.: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3961-3965, (1975).
- Hayashi, S., Gillam, I.C., Delaney, A.D., Dunn, R., Tener, G.M., Grigliatti, T.A., Suzuki, D.T.: Hybridization of tRNAs of *Drosophila melanogaster* to polytene chromosomes. *Chromosoma* 76, 65-84, (1980).
- Hayashi, S., Addison, W.R., Gillam, I.C., Grigliatti, T.A. and Tener, G.M.: Hybridization of tRNAs of *Drosophila melanogaster* to the region of the 5S RNA genes of the polytene chromosomes. *Chromosoma*, (1981), im Druck.
- Hervé, G. and Chapeville, F.: Incorporation of phenyl-lactic acid in terminal position during polyphenyl-alanine biosynthesis. *J. Mol. Bio.* 13, 757-766, (1965).
- Holmes, W.M., Hurd, R.E., Reid, B.R., Rimerman, R.A., and Hatfield, G.W.: Separation of transfer ribonucleic acid by sepharose chromatography using reverse salt gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1068-1071, (1975).
- Hosbach, H.: Vergleich der Aminoacylierung und der Isoakzeptorenmuster der tRNA junger und alter Fliegen von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich, (1977).
- Hosbach, H.A., Silberklang, M. and McCarthy, B.J.: Evolution of a *Drosophila melanogaster* tRNA gene Cluster. *Cell* 21, 169-178, (1980).
- Hovemann, B., Sharp, S., Yamada, H. and Söll, D.: Analysis of a *Drosophila* tRNA gene cluster. *Cell* 19, 889-895, (1980).
- Hozumi, N. and Tonegawa, S.: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 3628-3632, (1976).

- Illmensee, K.: Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm and syncytal blastoderm transplanted into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux' Archiv 170, 267-298, (1972).
- Illmensee, K.: The potentialities of transplanted early gastrula nuclei of *Drosophila melanogaster*. Production of their imago descendants by germ-line transplantation. Wilhelm Roux' Archiv 171, 331-343, (1973).
- Kern, H.: Fractionation of nucleic acids with special regard to rapidly labeled RNA. Anal. Biochem. 67, 147-156, (1975).
- Kirby, J.D.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. Biochem. J. 64, 405-408, (1956).
- Kubli, E.: Localization of tRNA genes on *Drosophila melanogaster* polytene salivary gland chromosomes. In: Transfer RNA. D. Söll, J. Abelson, P.R. Schimmel (editors). Cold Spring Harbor Laboratory, (1980).
- Kubli, E.: Modification of transfer RNA in eukaryotes: an evolutionary interpretation. Trends Bioch. Sci. 5, 90-91, (1980).
- Laskey, R.A. and Mills, A.D.: Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Letters 82, 314-316, (1977).
- Levis, R., Dunsmuir, P. and Rubin, G.M.: Terminal repeats of the *Drosophila* transposable element copia: nucleotide sequence and genomic organization.
- Lifton, R.P., Goldberg, M.L., Karp, R.W. and Hogness, D.S.: The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and evolutionary implications. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 1047-1051, (1978).
- Lobban, P.E. and Kaiser, A.D.: Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. J.Mol. Biol. 78, 453-471, (1973).
- Loening, U.E.: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. Biochem. J. 113, 131-138, (1969).
- Matouschek, M., Dübendorfer, A., Kubli, E.: Studies on the incorporation of [^{32}P]-phosphate into low molecular RNA of *Drosophila melanogaster* cell lines. J. New York Entomol. Soc. 88, 75-85, (1980).

- Müller, F. and Clarkson, S.G.: Nucleotide sequence of genes coding for the tRNA^{Phe} and tRNA^{Tyr} from a repeating unit of *Xenopus laevis* DNA. *Cell* 19, 345-353, (1980).
- Olexa, S.A.: Characterization of a high molecular weight complex of aminoacyl-tRNA synthetases in *Drosophila melanogaster*. Ph. D Thesis, Temple University, Philadelphia, (1977).
- Olson, V.M., Laughney, K. and Hall, B.D.: Identification of the yeast DNA sequences that correspond to specific tyrosine-inserting nonsense suppressor loci. *J. Mol. Biol.* 132, 387-410, (1979).
- Pearson, R.L., Hancher, C.W., Weiss, J.F., Holladay, D.W. and Kelmers, A.D.: Preparation of crude transfer RNA and chromatographic purification of five transfer RNAs from calf liver. *Biochem. Biophys. Acta* 294, 236-249, (1973).
- Petes, T.D.: Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell* 19, 765-774, (1980).
- Potter, S.S. and Thomas, C.A.: The twodimensional fractionation of *Drosophila* DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 1023-1031, (1978).
- Potter, S.S., Brorein, W.J., Dunsmuir, P. and Rubin, G.M.: Transposition of elements of the 412, copia and 297 dispersed repeated gene families in *Drosophila*. *Cell* 17, 415-427, (1979).
- Prensky, W.: The radioiodination of RNA and DNA to high specific activities. In: Prescott, D.M., *Methods in Cell Biology* 13, 121-152, New York, Academic Press, (1975).
- Ritossa, F.M., Atwood, K.C. and Spiegelman, S.: On the redundancy of DNA complementary to amino acid transfer RNA and its absence from the nucleus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 54, 663-676, (1966).
- Schaffner, W., Gross, K., Telford, J. and Birnstiel, M.: Molecular analysis of the histone gene cluster of *Psammecinus miliaris*: II. The arrangement of the five histone-coding and spacer sequences. *Cell* 8, 471-478, (1976).
- Schmidt, T., Egg, A.H. and Kubli, E.: The localization of tRNA^{ASP} genes from *Drosophila melanogaster* by in situ hybridization. *Molec. Gen. Genet.* 164, 249-254, (1978).

- Schmidt, T. and Kubli, E.: The localization of tRNA^{Asn}, tRNA^{His} and tRNA^{Ala} genes from *Drosophila melanogaster* by in situ hybridization to polytene salivary gland chromosomes. *Chromosoma* 80, 277-287, (1980).
- Schmidt, Th.: Lokalisation von transfer RNA Genen durch "in situ" Hybridisierung bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich, (1980).
- Sharp, S., De Franco, D., Schmidt, T., Kubli, E., Silberklang, M., Hosbach, H., Gergen, P., Wensink, P. and Söll, D.: Gene structure and arrangement of the initiator tRNA genes of *Drosophila melanogaster*. (1981, in Vorbereitung).
- Sinsheimer, R.L.: Recombinant DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 415-438, (1977).
- Smith, G.P.: Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 507-513, (1974).
- So, M., Gill, R. and Falkow, S.: The generation of a ColEI-Ap^r cloning vehicle which allows detection of inserted DNA. *Molec. Gen. Genet.* 142, 239-249, (1975).
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517, (1975).
- Sprague, K.U., Hagenbückle, O. and Zuniga, M.: The nucleotide sequence of two silk gland alanine tRNAs: Implications for fibroin synthesis and for initiator tRNA structure. *Cell* 11, 561-579, (1977).
- Staden, R.: Further procedures for sequence analysis by computer. *Nucl. Acids Res.* 5, 1013-1015, (1978).
- Stark, G.R., and Williams, J.G.: Quantitative analysis of specific labelled RNAs using DNA covalently linked to diazobenzylloxymethyl-paper. *Nucl. Acids Res.* 6, 195-203, (1979).
- Strobel, E., Dunsmuir, P. and Rubin, G.M.: Polymorphisms in the chromosomal locations of elements of the 412, copia and 297 dispersed repeated gene families in *Drosophila*. *Cell* 17, 429-439, (1979).
- Szostak, J.W. and Wu, R.: Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 284, 426-430, (1980).

- Tartof, K. and Perry, R.P.: The 5S genes of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 51, 171-183, (1970).
- Tartof, K.D.: Unequal mitotic sister chromatid exchange and disproportionate replication as mechanisms regulating ribosomal RNA gene redundancy. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 491-500, (1974).
- Tartof, K.D.: Redundant genes. *Ann. Rev. Genetics* 9, 355-385, (1975).
- Tener, G.M., Hayashi, S., Dunn, R., Delaney, A., Gillam, I.C., Grigliatti, G.A., Kaufman, T.C., Suzuki, D.T.: In: Transfer RNA. J. Abelson, P.R. Schimmel, D. Söll (editors), Cold Spring Harbor Laboratory, (1980).
- Weber, L. and Berger, E.: Base sequence complexity of the stable RNA species of *Drosophila melanogaster*. *Biochem.* 15, 5511-5519, (1976).
- Wellauer, P.K. and Dawid, I.B.: The structural organization of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 10, 193-212, (1977).
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. and Suzuki, D.T.: Analysis of tRNAs during the development of *Drosophila*. *Develop. Biol.* 33, 185-195, (1973a).
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J. and Suzuki, D.T.: Activity of a transfer RNA modifying enzyme during the development of *Drosophila* and its relationship to the su(s) locus. *J. Mol. Biol.* 74, 635-651, (1973).
- White, B.N. and Tener, G.M.: Chromatography of *Drosophila* tRNA on BD-cellulose. *Can. J. Biochem.* 51, 896-902, (1973).
- Yen, P.H., Sodja, A., Cohen, M., Wu, M. and Davidson, D.: Sequence arrangement of tRNA genes on a fragment of *Drosophila melanogaster* DNA cloned in *E. coli*. *Cell* 11, 763-777, (1977).
- Yen, P.H. and Davidson, N.: The gross anatomy of a tRNA gene cluster at region 42 A of the *D. melanogaster* chromosome. *Cell* 22, 137-148, (1980).

C U R R I C U L U M V I T A E

von Robert Karl Dudler, geboren am 25. Oktober 1951 in
Zürich, Bürger von Bassersdorf (ZH) und Thal (SG).

- 1965 - 1972 Gymnasium der Kantionsschule Zürcher Ober-
land; Abschluss mit Mat. B.
- 1972 - 1977 Biologiestudium an der Universität Zürich
Hauptfach: Zoologie
Nebenfächer: Mathematik, Chemie, Botanik
 und Molekularbiologie
- Diplomarbeit unter der Leitung von PD Dr.
E. Kubli. Abschluss 1977 mit dem Diplom
als Zoologe.
- 1977 - 1981 Assistent am Zoologischen Institut der
Universität Zürich. Ausführung der Doktor-
arbeit unter der Leitung von PD Dr. E.
Kubli.

Während des Studiums an der Universität Zürich wurden Kurse und Vorlesungen folgender Dozenten besucht:

Bachofen, Baker, Batschelet, Biegert, Billeter, Birnstiel,
Briegel, Burla, Chen, Clarkson, Cook, Deak, Egger, Endress,
Eugster, Glaser, Gasser, Hediger, Hohl, Humbel, Jungen-
Hauschteck, Kägi, Kubik, Kubli, Kuhn-Schnyder, Kummer,
Kurt, Melli, Nievergelt, Nöthiger, Oswald, Rast, Rohweder,
Schaffner, Schächli, Schlittler, Schmid, Tardent, Wanner,
Weber, Wehner, Weissmann, Ziswiler.

